

ЗИГАНШИН АЙРАТ МАНСУРОВИЧ

**АНАЭРОБНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, УЧАСТВУЮЩИЕ В
КОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор,
зав. кафедрой микробиологии КФУ
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
кафедры микробиологии и иммунологии
Пермского государственного национального
исследовательского университета
Куюкина Мария Станиславовна (г. Пермь)

доктор биологических наук, профессор,
зав. лабораторией микробиологической
трансформации органических соединений
Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
Данова Марина Викторовна (г. Пушкино)

доктор медицинских наук, профессор,
зав. кафедрой микробиологии Оренбургского
государственного университета
Дерябин Дмитрий Геннадьевич (г. Оренбург)

Ведущая организация: Татарский научно-исследовательский институт
агрохимии и почвоведения (г. Казань)

Защита диссертации состоится «14» мая 2015 г. в 13.00 на заседании
диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла
Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского
при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан « » 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Накопление больших масс органических отходов и их применение без соответствующей обработки и обезвреживания создает реальную опасность загрязнения почв, водоемов и воздуха. Одним из наиболее эффективных и стабильных способов утилизации органических сельскохозяйственных, муниципальных и промышленных отходов является их анаэробная конверсия, позволяющая решать проблемы обезвреживания, концентрирования и деструкции отходов с получением возобновляемой энергии в виде выделяющегося биогаза. Анаэробная обработка биологических отходов снижает их негативное воздействие на окружающую среду и способствует сокращению выбросов парниковых газов (энергия из биомассы имеет CO_2 -нейтральный эффект). Во многих случаях переработанная остаточная масса может быть использована в качестве высококачественных органических удобрений в сельском хозяйстве (Vascenetti et al., 2013; Li et al., 2013).

Процесс анаэробной трансформации различного органического сырья с получением биометана – это целая цепочка биохимических реакций, осуществляемая функционально различными микроорганизмами в условиях отсутствия молекулярного кислорода. Микробные сообщества, ответственные за данный процесс, представляют собой хорошо сбалансированные системы, участники которых находятся в тесной взаимосвязи друг с другом. Отдельного внимания заслуживают метаногенные археи, замыкающие многостадийный анаэробный процесс. Применение современных молекулярных подходов показало, что большинство микроорганизмов в биогазовых реакторах находятся в некультивируемом состоянии (Narihiro, Sekiguchi, 2007). Однако чаще всего такой анализ нацелен на метаногенные археи, так как метаноархеи в реакторах менее разнообразны, нежели бактерии, и представляют собой “узкое горлышко” всего анаэробного процесса в условиях сбоя биотехнологического процесса. В отличие от других анаэробных процессов, лимитирующей стадией конверсии лигноцеллюлозы является гидролиз из-за плохой биологической доступности органического углерода в растительных волокнах в анаэробных условиях. Более того, ингибирование процесса, ведущего к торможению метаногенеза, также влияет и на ацетогенные бактерии, которые находятся в тесной взаимосвязи с гидрогенотрофными и ацетокластическими метаногенами. Такие нарушения на уровне ацетогенеза отражаются в избыточном накоплении органических кислот в неисправном реакторе (Demirel, Scherer, 2008). По обеим причинам анализ сообществ также должен быть направлен и на бактериальные консорциумы. Тем не менее количественных и качественных данных относительно сдвигов бактериальных сообществ в зависимости от используемого субстрата и параметров анаэробного процесса недостаточно. Таким образом, детальный анализ структуры и динамики бактериальных и архейных ассоциаций при конверсии органических отходов в сочетании с мониторингом анаэробного процесса должны обеспечить понимание функционирования микробных сообществ как необходимое условие повышения эффективности конверсии биомассы в биогаз.

В связи с низким содержанием углерода анаэробная конверсия навоза сопровождается относительно низкой продукцией биогаза, что экономически

невыгодно. Совместная обработка навоза с другими органическими субстратами является очень привлекательным решением для повышения эффективности анаэробного процесса, так как это приводит к лучшему распределению питательных веществ и микроэлементов в реакторах (El-Mashad, Zhang, 2010; Cuetos et al., 2011). Для создания более устойчивых систем биоэнергетики применение сельскохозяйственных отходов и побочных продуктов, таких как солома или другое лигноцеллюлозное сырье, не конкурирующее с производством продуктов питания, является одним из перспективных вариантов. Каскадное использование биомассы для производства различных видов топлива, таких как биодизель, биоэтанол и биогаз или других ценных продуктов, улучшает экобаланс энергетических культур. Например, послеспиртовая барда или жмых масличных семян все еще содержат значительный процент органического углерода, который может быть преобразован в метан при анаэробной утилизации. Тем не менее анаэробная конверсия такой остаточной биомассы в биогаз часто затруднена из-за несбалансированного C/N соотношения, высокого содержания клетчатки или присутствия соединений, ингибирующих активность микроорганизмов. Например, богатая белком биомасса (барда или жмых) может привести к ингибированию метаногенов аммиаком или сульфидами, в то время как лигноцеллюлоза устойчива к анаэробному гидролизу (Yue et al., 2013; Tuesorn et al., 2013). Стоит отметить, что использование экскрементов домашних птиц более проблематично, нежели навоза крупного рогатого скота (КРС) в связи с высоким содержанием азота, что в итоге приводит к ингибированию анаэробного процесса аммиаком (Abouelenien et al., 2010; Niu et al., 2013). Обычно послеспиртовая барда и сухая барда с растворимыми веществами (DDGS) используются для откорма скота и производства кормовых препаратов. Для увеличения срока хранения и снижения транспортных расходов сырую барду подвергают сушке, что является энергоемким процессом и потребляет около одной трети от потребности в энергии всего завода (Bothast, Schlicher, 2005). Кроме того, использование сырой и сухой барды в качестве корма для КРС требует высоких стандартов качества. Поэтому анаэробная трансформация барды в биогаз рассматривается как альтернативный источник дохода для спиртовых заводов. Наряду с продукцией биогаза в анаэробных условиях может происходить и обезвреживание экологически опасных химикатов, загрязнителей почв, водных ресурсов, воздуха, в частности нитроароматических ксенобиотиков (например, 2,4,6-тринитротолуола и его производных), что может являться альтернативой детоксикации объектов, загрязненных данными поллютантами. Однако нитроароматические ксенобиотики являются устойчивыми к биологическому разрушению и с трудом вовлекаются в биогеохимический круговорот веществ (Wittich et al., 2008; Stenuit et al., 2012). Таким образом, развитие адаптированных биотехнологий преобразования остаточной биомассы требует детального понимания микробных процессов конверсии нетрадиционной биомассы.

Новые научные результаты в области раскрытия структурной организации и выявления закономерностей функционирования анаэробных микробных сообществ в перспективе станут основой биотехнологий, направленных на достижение стабильности, оптимизации и интенсификации процесса конверсии биомассы с продукцией биометана.

Целью работы стала разработка методологических основ выявления структурной организации и закономерностей функционирования бактериальных и метаногенных сообществ в анаэробных реакторах для создания эффективных способов анаэробной конверсии различных органических отходов в биогаз с определением оптимальных значений ключевых параметров анаэробного процесса.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие **основные задачи**:

- Оценка влияния исходного субстрата и смены температурного режима с мезофильного на термофильный на структуру и динамику развития бактериальных и архейных сообществ в лабораторных анаэробных установках, а также на эффективность анаэробной трансформации остаточной биомассы с получением биогаза;
- Оценка параметров развития микробного сообщества, важных для эффективной анаэробной переработки органических отходов спиртового производства в биогаз, и обоснование целесообразности внесения ионов железа в лабораторные реакторы для увеличения выхода биометана;
- Выявление эффекта снижения времени удерживания субстрата и иммобилизации микроорганизмов на активность микробного сообщества в процессе утилизации органических отходов спиртовой промышленности и эффективность работы лабораторных установок различной модификации;
- Определение структуры микробного консорциума в опытно-промышленном биогазовом реакторе и основных параметров анаэробной переработки отходов агропромышленного комплекса с учетом природно-климатических условий Республики Татарстан;
- Выявление эффекта действия ряда нитроароматических ксенобиотиков, в частности 2,4,6-тринитротолуола и его метаболитов, на состав анаэробных микробных сообществ и процесс анаэробной конверсии органических отходов сельского хозяйства в биогаз; оценка потенциала микробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола в анаэробных условиях;
- Оценка возможности биодеструкции нитроароматических соединений, в частности 2,4,6-тринитротолуола и его метаболитов, аэробными микроорганизмами с последующей обработкой полученных метаболитов в анаэробных условиях; выявление эффекта предварительной обработки 2,4,6-тринитротолуола аэробными микроорганизмами на продукцию биогаза и состав анаэробных микробных ассоциаций.

Научная новизна. Получены новые данные в области структурной организации и динамики развития биогаз-продуцирующих бактериальных и архейных ассоциаций в зависимости от исходного субстрата и температурного режима посредством применения микробиологических, а также современных молекулярно-биологических методов анализа (пиросеквенирование, секвенирование, T-RFLP анализ, неметрическое многомерное шкалирование). Разработаны эффективные способы анаэробной конверсии различных органических отходов сельского хозяйства и спиртовой промышленности в биогаз с определением оптимальных значений ключевых параметров процесса в лабораторных реакторах с непрерывным перемешиванием. Наиболее высокий

удельный выход биогаза достигнут при анаэробной обработке навоза КРС и послеспиртовой барды, навоза КРС и кукурузного силоса низкого качества, а также жмыха семян *Jatropha*. Выявлено ингибирование ацетокластического метаногенеза в реакторе, утилизирувавшем навоз КРС и куриный помет, в связи с чем предполагается синтрофное окисление ацетата в качестве основного процесса его поглощения в данном реакторе.

Получены новые и детальные знания о таксономической принадлежности бактериальных и архейных участников анаэробной конверсии отходов спиртового производства с применением методов молекулярной биологии. Показано, что метаногены рода *Methanosarcina* являются индикаторными организмами для эффективного и стабильного процесса получения биогаза из послеспиртовой барды (в качестве моносубстрата) при высокой нагрузке по органике, тогда как метаногены рода *Methanosaeta* являются характеристикой стабильного ацетокластического метаногенеза при низкой нагрузке по органике. Разработан эффективный способ разложения органических отходов спиртового производства с повышенным выходом биогаза, стимулирующий развитие разнообразного метаногенного консорциума. Показана целесообразность внесения ионов Fe^{3+} в лабораторные реакторы с непрерывным перемешиванием для осаждения токсичного сероводорода в виде нетоксичного сульфида железа. Выявлено ингибирование метаногенов растворенным сероводородом в отсутствие ионов Fe^{3+} . Впервые обнаружено, что синтрофные связи между ацетогенными бактериями и ацетокластическими метаногенами были более стабильны в реакторах, снабжаемых FeCl_3 .

Впервые оценен эффект снижения времени удерживания субстрата и иммобилизации микроорганизмов на различных носителях на активность микроорганизмов и стабильность работы биогазовых реакторов различного типа в процессе утилизации жидкой фракции послеспиртовой барды. Выявлено, что наряду с другими факторами постепенное снижение времени удерживания субстрата вызывало изменения в структуре и активности водород-продуцирующего бактериального и метаногенного консорциумов во всех реакторах. С уменьшением времени удерживания нестабильность анаэробного процесса сначала наблюдалась в реакторе переменного действия, а далее в реакторе с непрерывным перемешиванием. Реактор с неподвижным слоем стабильно функционировал до конца экспериментов.

Впервые получены данные о разнообразии микробных ассоциаций первого опытно-промышленного биогазового реактора, функционирующего на животноводческой ферме Буинского муниципального района Республики Татарстан, с учетом природно-климатических условий республики. Кроме того, определены ключевые параметры анаэробной деструкции отходов агропромышленного комплекса в данном биогазовом реакторе.

Впервые исследовано влияние нитроароматических ксенобиотиков, в частности 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) и его метаболитов, на состав анаэробных микробных сообществ и процесс анаэробной трансформации отходов сельского хозяйства. Оценен потенциал трансформации ТНТ анаэробными микроорганизмами, и выявлены основные пути метаболизма ТНТ в анаэробных

условиях. Проведена предварительная биодеструкция ТНТ аэробными микроорганизмами с последующей обработкой полученных метаболитов в анаэробных условиях. Протестированы два аэробных штамма дрожжей – *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3492 и *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037, способных осуществлять трансформацию ТНТ по пути присоединения гидрид-ионов к его бензольному кольцу с последующей аккумуляцией нитрит-иона и нитрат-иона в средах роста. Способность к денитрации метаболитов в сочетании с конверсией нитрит-иона в нитрат-ион выделенными дрожжами уникальна и представляет интерес в области биоремедиации объектов, загрязненных нитроароматическими веществами. Все метаболиты ТНТ, обнаруженные как в анаэробных, так и аэробных условиях, охарактеризованы с применением усовершенствованных физико-химических методов анализа. Кроме того, впервые выявлен положительный эффект сочетания аэробной и анаэробной трансформации исходного поллютанта.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в рамках диссертационной работы научные данные составляют основу знаний об организации и функционировании бактериальных и метаногенных сообществ-продуцентов биогаза. Научные результаты проведенной работы дополнили информационные базы данных по разнообразию микроорганизмов и позволили достоверно выявить закономерности функционирования анаэробных микробных ассоциаций в зависимости от параметров работы установок.

Результаты работы, апробированные в лабораторных анаэробных установках, планируются к внедрению на ряде животноводческих ферм и птицефабрик Республики Татарстан (Россия) для переработки и утилизации навоза и куриного помета с целью получения возобновляемой энергии в виде выделяющегося биогаза и качественного органического и азотного удобрения. Полученные результаты в перспективе улучшат потребительские свойства существующей технологии переработки остаточной биомассы, а также повысят экологическую безопасность перерабатывающего производства.

Масштабность возможного использования экспериментально подтвержденных данных вытекает из контингента потребителей биогазовых установок – это агропромышленные предприятия, крупные агрохолдинги и фермерские хозяйства, сталкивающиеся с проблемой утилизации навоза или птичьего помета, предприятия пищевой промышленности (например, спиртовая, молочная, сахарная, мясная), а также в перспективе полученные научные данные могут успешно применяться для нужд жилищно-коммунального хозяйства, государственной ветеринарной службы.

Проведенная работа выявила новые детали механизмов трансформации токсичных и устойчивых к деградации нитроароматических соединений (на примере ТНТ и его метаболитов) анаэробными и аэробными микроорганизмами, что может быть эффективно использовано для биологической очистки объектов, загрязненных данными поллютантами. Запатентованы два штамма, *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3492 и *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037, как уникальные деструкторы ТНТ и его метаболитов.

Материалы докторской диссертации используются в лекционных курсах и на практических занятиях “Прикладная микробиология”, “Физико-химические и

микроскопические методы в микробиологии”, “Биотопливо и биоэнергетика”, “Экологическая биотехнология” Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Методология и методы исследования. Поставленные задачи были решены с применением микробиологических, молекулярно-биологических и физико-химических методов исследования (полимеразная цепная реакция, электрофорез в агарозном геле, клонирование генов, рестрикционный анализ амплифицированной ДНК, T-RFLP анализ, неметрическое многомерное шкалирование, секвенирование, пиросеквенирование, УФ-видимая спектрофотометрия, газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, ионная хроматография, масс-спектрометрия, ЭПР спектроскопия, титриметрия и другие методы). Результаты исследований обработаны общеизвестными математическими методами статистики.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Разработаны методологические основы выявления структурной организации и закономерностей функционирования бактериальных и метаногенных ассоциаций в анаэробных реакторах, а также определена таксономическая принадлежность бактериальных и архейных участников анаэробной конверсии различных органических отходов;
- Разработаны эффективные способы микробной конверсии различных органических отходов сельского хозяйства и спиртовой промышленности в биогаз с определением оптимальных значений ключевых параметров анаэробного процесса в установках различной модификации;
- Показана целесообразность внесения ионов Fe(III) в лабораторные реакторы для оптимизации синтрофных отношений между ацетогенными бактериями и ацетокластическими метаногенами, повышения продукции метана и снижения выделения сероводорода;
- Выявлен эффект иммобилизации микроорганизмов на стабильность работы анаэробных реакторов различного типа и активность водород-продуцирующего бактериального и метаногенного консорциумов, связанный со снижением времени удерживания субстрата в реакторах;
- Оценен потенциал трансформации 2,4,6-тринитротолуола сообществом анаэробных микроорганизмов, а также выявлены основные пути анаэробного метаболизма 2,4,6-тринитротолуола, ведущие к формированию продуктов трансформации исходного ксенобиотика с последующей их элиминацией;
- Выявлена высокая эффективность сочетания аэробной и анаэробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола, что сопровождалось полной деструкцией исходного ксенобиотика с последующим удалением сформировавшихся метаболитов.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также опубликованием полученных результатов работы в международных и отечественных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Полученные в рамках диссертационной работы результаты и сформулированные на их основе заключение и положения, выносимые на защиту, **являются новым крупным научным достижением в области микробиологии**; в диссертационной работе также **решена научная проблема, имеющая важное народно-хозяйственное значение**.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 2nd International Conference on “Biogas Microbiology” ICBM (Уппсала, Швеция, 2014), 14th International Symposium on “Microbial Ecology” (Копенгаген, Дания, 2012), 1st International Conference on “Biogas Microbiology” ICBM (Лейпциг, Германия, 2011), Annual Congress of the General and Applied Microbiology Association (Карлсруэ, Германия, 2011), International Water Association – IWA’s Specialized Conference on “Microbes in Wastewater and Waste Treatment, Bioremediation and Energy Production” (Гоа, Индия, 2011), XIV International Conference Devoted to the 20th Anniversary of Partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University “Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine” (Казань, 2009), 1st Interuniversity Conference on Modern Biology “Bio-news” (Казань, 2008), Environmental and Subsurface Science Symposium, featuring Biotechnology and Bioremediation (Логан, Юта, США, 2007), International Conference “Modern Development of Magnetic Resonance” (Казань, 2007), IV-ой международной научно-практической конференции “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине” (Казань, 2014), I-ой международной интернет-конференции “Энергетика в современном мире” (Казань, 2013), II-ой интернет-конференции “Грани науки – 2013” (Казань, 2013), II-ой Всероссийской интернет-конференции “Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии” (Казань, 2011), X-ой Всероссийской выставке научно-технического творчества молодежи (Москва, 2010), XVI-ой международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2009), II-ом Санкт-Петербургском международном экологическом форуме “Окружающая среда и здоровье человека”, конгресс “Экотоксиканты и здоровье человека” (Санкт-Петербург, 2008), региональной конференции молодых ученых с международным участием “Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии” (Екатеринбург-Пермь, 2007), 11-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2007).

Место выполнения работы и личный вклад соискателя. Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории экологической биотехнологии и биомониторинга кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Автором диссертации совместно с научным консультантом сформулированы цели, задачи и основные направления исследовательской работы. Диссертантом лично выполнена основная часть экспериментальных исследований, проведены анализ и интерпретация полученных результатов, сформулировано заключение. Ряд экспериментов по анаэробной обработке органических отходов автор проводил в лабораториях Dr. Frank Scholwin (German Biomass Research Centre, Лейпциг, Германия). Некоторые исследования, направленные на установление таксономической принадлежности представителей

микробных сообществ, автор проводил в лабораториях Dr. Sabine Kleinsteuber (Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Лейпциг, Германия) и междисциплинарном Центре геномных и протеомных исследований КФУ (Казань). Хроматографический и масс-спектрометрический анализ продуктов трансформации нитроароматических соединений был проведен автором в лабораториях Prof. Dr. Robin Gerlach (Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Бозмен, США) и лабораториях Prof. Dr. Andreas Kappler (Center for Applied Geoscience, Eberhard Karls University, Тюбинген, Германия). ЭПР исследования выполнены на кафедре квантовой электроники и радиоспектроскопии Института физики КФУ при помощи А.А. Родионова.

Связь работы с научными программами. Исследования поддержаны государственным контрактом № 12081p/22874 (2013-2014 гг), государственным заданием № 9168 (2014 г), проектами № 8159 и № 15079 аналитической ведомственной целевой программы “Развитие научного потенциала высшей школы” (2009-2011 гг), проектом № 14-04-31694 Российского фонда фундаментальных исследований (2014-2015 гг), грантами Правительства Республики Татарстан “Алгарыш” (2008 г, 2010 г и 2013 г), программами Фулбрайта (США; 2006-2007 гг) и DAAD (Германия; 2009 г, 2011 г и 2014 г), а также грантом ICA2-CT-2000-10006 (European Commission Research and Technological Development Program Copernicus; 2000-2004 гг). Часть работы выполнена в соответствии с Российской Правительственной Программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 40 печатных работ, в том числе 14 работ в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Кроме этого, получено 4 патента РФ и опубликовано 22 тезиса докладов научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 296 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 45 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (первая глава), описания материалов и методов исследования (вторая глава), четырех глав описания и обсуждения результатов исследований, заключения и 303-х библиографических ссылок (список литературы).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Параметры процессов. Анаэробная деструкция сельскохозяйственных отходов в лабораторных биогазовых установках. В таблицах 1 и 2 отображены основные технологические параметры анаэробной деструкции органических отходов сельского хозяйства с получением биогаза (в точках отбора проб, когда структура микробного сообщества была проанализирована). Анаэробную деструкцию сельскохозяйственных отходов проводили в 11 лабораторных реакторах с непрерывным перемешиванием разного объема. Внесение субстрата и выгрузку переработанной смеси проводили ежедневно. Выход биогаза, его состав и рН измеряли каждый день, тогда как концентрацию органических кислот и ионов аммония – 2 раза в неделю.

Анаэробная деструкция отходов спиртового производства в лабораторных биогазовых установках. Влияние ионов Fe^{3+} на анаэробный процесс. В данных экспериментах послеспиртовая сухая барда стандарта DDGS (CropEnergies AG) была подвергнута анаэробной конверсии в 5 л лабораторных мезофильных реакторах с непрерывным перемешиванием, а также отслежен эффект удаления H_2S на производительность реакторов. Основные параметры анаэробного разложения DDGS представлены в таблицах 3 и 4. Внесение новой порции DDGS и других компонентов, а также выгрузка переработанной смеси производились ежедневно. Выход биогаза, его состав и pH измеряли каждый день, органические кислоты и аммоний – 2 раза в неделю. Влияние снижения времени пребывания субстрата в реакторах на анаэробный процесс. При проведении экспериментов по изучению влияния снижения времени удерживания субстрата (ВУ) на анаэробный процесс в качестве субстрата использовали сухую барду стандарта DDGS, подготовленную следующим образом. DDGS смешивали с водой в весовом соотношении 1:3.75 и тщательно перемешивали 24 ч. Далее смесь разделяли сепаратором; полученную жидкую фракцию (STS, simulated thin stillage) использовали для последующих экспериментов. К STS также добавляли FerroSorp DG в концентрации 37.2 мг на 1 г сухого вещества, а также раствор микроэлементов, содержащий 20 мг Ni, 5 мг Co, 40 мг Zn и 5 мг Mo на каждый кг сухого вещества в STS. NH_4HCO_3 ($5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) и KHCO_3 ($5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) добавляли к субстрату с 110 суток, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ($3.32 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) и KHCO_3 ($3.32 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) с 121 суток, а $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ($2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) и KHCO_3 ($2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) с 124 по 130 сутки для повышения pH в реакторах. Три реактора, реактор с непрерывным перемешиванием (CSTR), реактор с неподвижным (фиксированным) слоем (FBR) и реактор переменного действия (ASBR), были протестированы в экспериментах. Субстрат вносили 12 раз в сутки каждые 2 ч. Нагрузку по органике поддерживали на одном уровне во всех реакторах – $10 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. Время удерживания субстрата снижали с 6 до 1.5 суток в реакторах CSTR и FBR, тогда как в реакторе ASBR – с 6 до 3 суток. Субстрат в CSTR (5 л) непрерывно перемешивался лопастной мешалкой. FBR (12.9 л) с восходящим потоком жидкости заполняли наполнителем для иммобилизации микроорганизмов (biofilm carriers, диаметр 20 мм, площадь поверхности $0.123 \text{ м}^2 \cdot \text{л}^{-1}$; ENVIMAC Engineering). Содержимое ASBR (13 л) перемешивали 1 ч после внесения субстрата и наполняли носителем для иммобилизации (EvU-Pearl biofilm carriers, EvU-Innovative Umwelttechnik) на одну четверть высоты реактора. Выход биогаза, его состав и pH измеряли каждый день, концентрацию органических кислот и ионов аммония – 2 раза в неделю.

Анаэробная конверсия отходов сельского хозяйства в опытно-промышленном биогазовом реакторе. Первый в Республике Татарстан (Россия) опытно-промышленный биогазовый реактор располагается на животноводческой ферме Буинского муниципального района. Анаэробный мезофильный реактор с рабочим объемом 25 м^3 функционирует с 2010 г, его непрерывно снабжают органическими отходами, в основном навозом КРС и остаточной растительной биомассой. Образцы для анализов отбирали в октябре 2011 г и марте 2012 г.

Биотрансформация отходов предприятий, производящих взрывчатую продукцию. Метаболизм нитроароматических соединений в анаэробных условиях.

Анаэробную трансформацию нитроароматических соединений (на примере исходного вещества – 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) в концентрации 220, 440 и 660 мкМ) осуществляли совместно с навозом КРС и свиным навозом в герметично закрытых бутылках объемом на 0.3 л без перемешивания в мезофильных условиях. Метаболизм нитроароматических соединений в аэробных условиях с последующей обработкой в анаэробных условиях. Для успешной минерализации ТНТ проводили поиск микроорганизмов, способных осуществлять деструкцию исходного ксенобиотика и в аэробных условиях. Для поиска микроорганизмов, осуществляющих редукцию ароматического кольца ТНТ с его последующей денитрацией, использовали около 500 изолятов, полученных в лаборатории экологической биотехнологии и биомониторинга кафедры микробиологии Казанского Федерального Университета. Среди полученных изолятов наиболее эффективными деструкторами ТНТ и его метаболитов оказались два штамма – *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3492 и *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037, которые были запатентованы и протестированы в дальнейших экспериментах. Биомассу дрожжей накапливали в аэробных условиях на агаризованной среде Сабуро. Для изучения трансформации ТНТ использовали жидкую синтетическую среду, включавшую глюкозу – 28 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 7.6 мМ, MgSO_4 – 2 мМ. К-Na-фосфатный буферный раствор вносили в концентрации 16 мМ (рН 6.0-7.0). ТНТ добавляли из расчета 400-440 мкМ в растворе этанола (0.4 мл 96% этанола в 25 мл среды). Далее клетки культивировали в аэробных условиях ($150 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$) при 30°C. Оптическая плотность клеток после их внесения в среды соответствовала OD_{600} 0.35-1.0. В отдельных экспериментах, для изучения возможности вовлечения продуктов аэробной биологической деструкции ТНТ в анаэробный метаболизм, ТНТ, подвергшийся трансформации указанными штаммами дрожжей, а также накопленную биомассу дрожжей подвергали анаэробной конверсии в присутствии навоза КРС и свиного навоза.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы электронных таблиц. Результаты работы выражены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n=3$).

Методы. Содержание сухого вещества (СВ) в образцах анализировали после их высушивания в сухожаровом шкафу при 105°C в течение 1 ч. Содержание сухого органического вещества (СОВ) определяли после высушивания при 105°C в течение 1 ч с последующим прокаливанием в муфельной печи при 550°C 3 ч.

Продукцию биогаза измеряли с использованием газовых счетчиков MGC-1, а также барабанных газовых счетчиков TG 05 (Ritter, Bochum, Германия); состав биогаза исследовали с использованием инфракрасного газового анализатора GA 94 (Ansyco, Германия). Выход биогаза корректировали под нормальные условия (273.15 К и 101.325 кПа).

Общую концентрацию органических кислот в эффлюенте измеряли на титраторе Titration Excellence T 90 (Mettler-Toledo, Швейцария), используя 0.025-0.1 М раствор H_2SO_4 в диапазоне рН от 4.5 до 3.5.

Спектрофотометрические измерения. Концентрацию ионов аммония определяли в жидкой фазе образцов после отделения твердой фазы центрифугированием при $20000 \times g$ в течение 20 мин. Далее супернатант

окрашивали реактивом Несслера (Sigma-Aldrich) и измерения проводили на спектрофотометре DR/2000 (Hach Company, США) при 425 нм. Клеточную массу дрожжей оценивали, измеряя оптическую плотность при 600 нм на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, США). Общее количество тотальной ДНК и РНК, а также ПЦР-продуктов оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (PecLab, Германия).

Газовая хроматография. Летучие жирные кислоты (ЛЖК) анализировали на газовом хроматографе 5890 series II GC (Hewlett Packard, США), оснащенном пробоотборником и колонкой Agilent HP-FFAP (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм). В качестве подвижной фазы использовали N₂ при скорости потока 17 мл·мин⁻¹. Температуру термостата колонки сначала повышали от 60°C до 100°C со скоростью 20°C·мин⁻¹, затем до 140°C со скоростью 5°C·мин⁻¹ и на конечном этапе до 200°C со скоростью 40°C·мин⁻¹. Пробы анализировали после внесения 0.5 мл 85% H₃PO₄ во флаконы емкостью 10 мл, содержащие 3 мл супернатанта. Далее флаконы плотно закрывали и газовую фазу вводили в хроматограф.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. ТНТ и продукты различных путей его трансформации исследовали на хроматографе 1100 Series HPLC (Agilent Technology, США), оснащенном пробоотборником, инжектором, DAD детектором, предколонкой Supelcosil LC-8 и колонкой Supelcosil octyl C-8 (150 × 4.6 мм; 5 мкм). Разделение соединений осуществляли при 36°C и 50°C. Скорость потока составляла 1 мл·мин⁻¹. Вначале мобильная фаза состояла из 99% Na-фосфатного буферного раствора (pH 7.0, 25 мМ) и 1% метанола. Далее в течение 2 мин количество метанола повышали до 30%, в течение следующих 13 мин его содержание увеличивали до 43%. Следующие 12.5 мин хроматографии были связаны с увеличением содержания метанола до 100%. Полученный градиент оставляли постоянным в течение следующих 30 сек.

Ионная хроматография. NO₂⁻ и NO₃⁻ анализировали с использованием ионного хроматографа Dionex (США), оснащенного пробоотборником, кондуктометрическим детектором, предколонкой IonPac AG9-НС (4 × 50 мм) и колонкой IonPac AS9-НС (4 × 250 мм). Хроматографию проводили 9 мМ раствором Na₂CO₃ со скоростью 1 мл·мин⁻¹.

ЭПР спектроскопия. NO детектировали в синтетической среде с клетками дрожжей после внесения натрия N,N-диэтилдитиокарбамата (NaДЭТК; 5.8 мМ) и FeSO₄ (2.6 мМ). Полученную смесь инкубировали 30 мин при 37°C, охлаждали и смешивали с этилацетатом (0.2 мл). Затем смесь осаждали центрифугированием при 6000×g в течение 10 мин. Далее органическую фазу вносили в трубки с внутренним диаметром 1 мм (Sigma-Aldrich) и регистрировали спектры ЭПР на спектрометре ESP-300 (Bruker, Германия) в соответствии с Fujii and Berliner (1999).

Выделение и очистка тотальной ДНК и РНК. Тотальную ДНК экстрагировали и очищали с использованием FastDNA SPIN Kit for soil (Qbiogene) либо PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO). Тотальную РНК выделяли с использованием RNeasy Mini Kit (QIAGEN) и подвергали очистке от ДНК TURBO DNA-free Kit (Ambion).

Получение комплементарной ДНК (кДНК). кДНК получали с использованием RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit и случайных гексамерных праймеров (Fermentas).

Амплификация генов. Бактериальные гены 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР с тотальной ДНК в термоциклере DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США), используя пару универсальных праймеров UniBac27f и Univ1492r и 2×Taq Master Mix (QIAGEN). Реакцию начинали с денатурации при 94°C в течение 4 мин и с последующими 30 циклами: денатурация при 94°C в течение 45 сек, отжиг при 58°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 2 мин. Конечную элонгацию проводили при 72°C в течение 20 мин. Архейные гены 16S рРНК амплифицировали с применением универсальных праймеров UniArc21F и UniArc931R либо UniArc8F и UniArc931R, а также 2×Taq Master Mix. ПЦР начинали с денатурации при 95°C в течение 5 мин и с последующими 35 циклами: денатурация при 94°C в течение 1 мин, отжиг при 54°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 2 мин. Конечную элонгацию проводили при 72°C в течение 20 мин. Гены *hydA* ПЦР-амплифицировали, используя комбинацию универсальных праймеров *hydA*-S1 и *hydA*-A1 и 2×Taq Master Mix. ПЦР начинали с денатурации при 94°C в течение 3 мин и с последующими 35 циклами: денатурация при 94°C в течение 45 сек, отжиг при 51°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 2 мин. Конечную элонгацию проводили при 72°C в течение 20 мин. Гены *mcrA* амплифицировали с применением универсальных праймеров *mcrA*-mlas и *mcrA*-rev и 2×Taq Master Mix. Амплификация *mcrA* генов включала денатурацию при 95°C в течение 3 мин; 5 циклов по 30 сек при 95°C, 45 сек при 48°C, 30 сек при 72°C; 30 циклов по 30 сек при 95°C, 45 сек при 52°C, 30 сек при 72°C; конечная элонгация при 72°C в течение 20 мин. Амплификация клонированных генов. Положительные клоны отбирали и переносили в 96-луночные микропланшеты, содержащие по 100 мкл H₂O в каждой лунке. Далее клетки разрушали в микроволновой печи в течение 1 мин (мощность 700 Ватт) и проводили ПЦР для проверки вставки гена 16S рРНК, *hydA* либо *mcrA* в плазмиду, используя вектор-специфичные M13 праймеры и 2×PCR Master Mix (Promega). Реакцию начинали с денатурации при 95°C в течение 3 мин и с последующими 30 циклами: денатурация при 95°C в течение 45 сек, отжиг при 55°C в течение 45 сек и элонгация при 72°C в течение 2 мин. Конечную элонгацию проводили при 72°C в течение 5 мин.

Электрофорез в агарозном геле. Продукты амплификации генов 16S рРНК, *hydA* и *mcrA* с тотальной ДНК или кДНК, а также продукты амплификации, полученные с применением вектор-специфичных праймеров, разделяли электрофоретически в гелях 1.5% LE агарозы. Размеры ПЦР-продуктов и рестрикционных фрагментов определяли после их разделения в гелях агарозы. После разделения фрагменты визуализировали, используя флуоресцентный краситель SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) и программы Image Reader FLA-3000 Series Version 1.11 и AIDA Version 2.31.

Очистка амплифицированных генов 16S рРНК, *hydA* и *mcrA*. ПЦР-продукты очищали с использованием QIAGEN PCR Purification Kit.

Клонирование генов 16S рРНК, *hydA* и *mcrA*. Гены 16S рРНК, *hydA* и *mcrA* лигировали с использованием QIAGEN PCR Cloning Kit согласно инструкции производителя. Далее продуктами лигирования трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* DH5α.

Рестрикционный анализ амплифицированной ДНК. М13 ампликоны в количестве 1 мкл обрабатывали эндонуклеазой HaeIII (New England Biolabs) и разделяли электрофоретически в гелях агарозы. Длины рестрикционных фрагментов анализировали программами Phoretix™ 1D 2.00 и Phoretix™ 1D 5.20 (Nonlinear Dynamics), клоны объединяли в кластеры и строили дендограммы. Репрезентативные клоны из больших кластеров отбирали для последующего определения их нуклеотидных последовательностей.

Секвенирование фрагментов генов 16S рПНК, *hydA* и *mcrA*. Для частичного секвенирования клонов гена бактериальной 16S рПНК использовали 16S рПНК-специфичные праймеры – UniBac27f и Univ519r, а также М13 праймеры. Клоны гена архейной 16S рПНК, клоны генов *hydA* и *mcrA* секвенировали с применением М13 праймеров. Определение нуклеотидных последовательностей клонированных генов проводили с применением Big Dye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit на ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Данные анализировали программами ABI PRISM DNA Sequencing Analysis software (Applied Biosystems) и Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation). BLAST (Altschul et al., 1990) далее применяли для поиска сходных последовательностей в базе данных NCBI. RDP Classifier (Wang et al., 2007) использовали для определения таксономической принадлежности идентифицированных 16S рПНК фрагментов. Построение филогенетических деревьев проводили, используя программы SILVA (Pruesse et al., 2007) и MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Данные были проверены на присутствие химерных последовательностей с использованием программы Bellerophon (Huber et al., 2004). Нуклеотидные последовательности, полученные в работе, депонированы в GenBank под номерами HQ290266-290317, JX426167-JX426256, KC412560-KC412632, KF419189-KF419207, KF551959-KF551969.

T-RFLP анализ. При проведении T-RFLP анализа бактериальные гены 16S рПНК амплифицировали, используя комбинацию праймеров UniBac27f-FAM и Univ1492r, архейные гены 16S рПНК – с использованием праймеров UniArc8F-FAM / UniArc21F-FAM и UniArc931R, гены *hydA* – с применением праймеров *hydA*-S1-FAM и *hydA*-A1, а гены *mcrA* – с использованием праймеров *mcrA*-mlas и *mcrA*-rev-FAM. Для ПЦР использовали 2×*Taq* Master Mix (QIAGEN); параметры реакции указаны выше. Далее ампликоны анализировали с помощью электрофореза и очищали, применяя набор SureClean Plus (Bioline). После этого ампликоны бактериальных генов 16S рПНК обрабатывали рестриктазами HaeIII и RsaI, ампликоны архейных генов 16S рПНК обрабатывали HaeIII, RsaI и MseI, ампликоны генов *hydA* – MspI и RsaI, а ампликоны генов *mcrA* – HaeIII и MspI (New England Biolabs). Затем фрагменты ДНК осаждали 3М уксусной кислотой (pH 5.5) и этанолом. После удаления супернатанта осадок высушивали в вакууме и подсушенные ДНК фрагменты ресуспендировали в растворе, содержащем 10 мкл Hi-Di формамида и 0.25 мкл GeneScan 500 ROX или 1200 LIZ Size Standards (Applied Biosystems). Пробы денатурировали при 95°C в течение 5 мин, охлаждали и анализировали на ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Полученные T-RFLP-граммы анализировали программами GeneMapper V3.7 и Peak Scanner Software (Applied Biosystems) и обрабатывали с использованием программного обеспечения R script (Abdo et al., 2006). Флуоресцентные сигналы T-RF генов 16S рПНК

бактерий и *mcrA* экстрагировали в диапазоне 50-500 п.о.; T-RF генов *hydA* – в диапазоне 40-500 п.о.; T-RF генов 16S рПНК архей – в диапазоне 35-900 п.о. Результаты T-RFLP выражены в виде средних значений (n=2 или n=3).

Неметрическое многомерное шкалирование (NMDS) с применением индекса сходства Брея-Кёртиса относительно присутствия/отсутствия и относительного распространения концевых рестрикционных фрагментов было применено для анализа сходства T-RFLP профилей. Основные параметры анаэробного процесса, коррелирующие с составом микробного сообщества, а также с отдельными концевыми рестрикционными фрагментами, были установлены с помощью алгоритма “envfit”, предоставленного пакетом “vegan”. Значимость отдельных параметров анаэробного процесса на результаты NMDS была протестирована с помощью теста Монте-Карло.

Пиросеквенирование. В некоторых экспериментах бактериальные фрагменты генов 16S рПНК были амплифицированы в ПЦР реакциях с праймерами UniBac27f и Univ519r, используя Phire Hot Start II DNA полимеразу (Thermo Scientific). После 25 циклов проводили дополнительные 10 циклов, применив 454 фьюжн-праймеры с введенными последовательностями мультиплексного идентификатора. Полученные ампликоны очищали из агарозного геля с использованием MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) и качественно оценивали на Agilent 2100 Bioanalyzer (США). Флуориметрическое количественное определение и подготовка библиотеки ампликонов проводились в соответствии с методическим руководством GS Junior (Roche). Ампликоны 13 образцов (реакторы R 3.1, R 4.5, R 4.6, R 4.8, R 4.13, R 4.14, R 4.15, R 4.16, R 4.17, R 4.19 и R 4.20) применяли для эмульсионной ПЦР с использованием Lib-L emPCR Kit (Roche). Пиросеквенирование проводили на GS Junior PicoTiter plate. Анализ полученных данных и сортировку мультиплексных идентификаторов осуществляли, используя программное обеспечение GS Junior. Полученные последовательности далее обрабатывали с использованием RDP pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Анаэробная конверсия отходов сельского хозяйства в лабораторных реакторах

1.1 Основные параметры работы анаэробных реакторов

В таблицах 1 и 2 отображены основные технологические параметры анаэробной конверсии органических отходов сельского хозяйства с образованием биогаза в реакторах с непрерывным перемешиванием в течение экспериментального периода продолжительностью 63 сут.

В реакторе R 3.1, утилизовавшем куриный помет и навоз КРС, наблюдалась аккумуляция самой высокой концентрации ионов аммония (до $5.93 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ аммонийного азота) по сравнению с другими реакторами. Повышение нагрузки по органике с 1.78 до $2.84 \text{ ГОСВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ сопровождалось снижением выхода биогаза с 390 до $290 \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ОСВ}$ с содержанием метана $\sim 57\%$. Повышенная нагрузка по органике приводила также и к накоплению ЛЖК в реакторе, что указывает на сильное ингибирование ацетогенеза и метаногенеза (Таблицы 1 и 2).

Таблица 1 – Параметры работы лабораторных биогазовых реакторов

Реактор ^a	Образец	Объем (л)	Температура (°C)	Нагрузка по органике (госв.л ⁻¹ ·сут ⁻¹)	Состав субстрата (г·сут ⁻¹)								Время Удерживания (сут)
					Навоз КРС	Куриный помет	DDGS	Силос кукурузы	Солома кукурузы	Жмых семян <i>Jatropha</i>	FerroSorp DG	Сумма ^b (мл·сут ⁻¹)	
R 3.1	1	36.5	40	1.78	454	112	-	-	-	-	-	567	64.4
	2			2.42	567	140	-	-	-	-	-	708	51.6
	3			2.84	649	160	-	-	-	-	-	810	45.1
R 4.5	1	12.0	38	2.43	529	-	-	-	-	-	-	530	22.6
	2	8.0	39	2.45	308	-	-	-	-	-	-	333	24
	3	8.0	55	0.50	69	-	-	-	-	-	-	333	24
R 4.6	1	8.0	38	2.45	178.6	-	11.64	-	-	-	-	333	24
	2		39	2.45	154.08	-	10.43	-	-	-	-	333	24
	3		54	0.50	34.54	-	2.39	-	-	-	-	333	24
R 4.8	1	10.0	37	1.50	182.5	-	-	17.5	-	-	-	400	25
	2			1.50	182.5	-	-	17.5	-	-	-	400	25
	3			1.50	182.5	-	-	17.5	-	-	-	400	25
R 4.13	1	30.0	38	2.47	723.6	-	-	-	28.2	-	-	857	35
	2			2.37	518.7	-	-	-	26.3	-	-	857	35
	3			2.39	694.6	-	-	-	26.3	-	-	857	35
R 4.14	1	30.0	38	2.47	723.6	-	-	-	28.2	-	-	857	35
	2			2.37	518.7	-	-	-	26.3	-	-	857	35
	3			2.39	694.6	-	-	-	26.3	-	-	857	35
R 4.15	1	30.0	38	2.40	723.6	-	-	-	83.7	-	-	857	35
	2			2.29	518.7	-	-	-	78.1	-	-	857	35
	3			2.30	694.6	-	-	-	78.1	-	-	857	35
R 4.16	1	30.0	38	2.40	723.6	-	-	-	83.7	-	-	857	35
	2			2.29	518.7	-	-	-	78.1	-	-	857	35
	3			2.30	694.6	-	-	-	78.1	-	-	857	35
R 4.17	1	100.0	38	2.00	1000	-	-	465	-	-	-	1465	68.3
	2			2.40	2000	-	-	400	-	-	-	2400	41.7
	3			2.50	1000	-	-	620	-	-	-	1620	61.7
R 4.19	1	9.0	38	1.84	-	-	-	-	-	19.96	-	225	40
	2			2.00	-	-	-	-	-	21.66	-	225	40
	3			2.20	-	-	-	-	-	23.51	-	225	40
R 4.20	1	9.0	38	1.84	-	-	-	-	-	19.96	-	225	40
	2			2.00	-	-	-	-	-	21.66	-	225	40
	3			2.20	-	-	-	-	-	23.51	1.39	225	40

^a Параметры работы реакторов представлены в трех точках отбора проб, когда микробные сообщества были проанализированы (образец 1: 29 сентября 2009; образец 2: 2 ноября 2009; образец 3: 30 ноября 2009); ^b вода была добавлена до получения конечной концентрации.

Таблица 2 – Основные технологические параметры анаэробной переработки отходов сельского хозяйства

Реактор ^a	Образец	Производство био- газа (л·свт ⁻¹ ·л ⁻¹)	Удельный выход биогаза (мл·г ⁻¹ осв)	Состав биогаза			pH	Летучие жирные кислоты (мг·л ⁻¹)				Органические кислоты (г·л ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (г·л ⁻¹)
				CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (ppm)		Уксусная	Пропио- новая	Изомас- ляная	Масляная		
R 3.1	1	0.68	390±8	57.5	39.5	1821	8.04	2441	595	46	16	6.09	5.17
	2	0.77	315±9	57.3	41.8	1682	7.90	5430	1988	183	46	9.57	5.17
	3	0.82	290±21	57.0	41.6	2989	7.96	9867	4058	324	620	15.36	5.93
R 4.5	1	0.61	253±5	65.5	33.7	~5000	7.77	121	12	н.о. ^б	н.о.	1.46	1.86
	2	0.85	348±49	63.3	36.2	2673	7.66	н.и.	н.и. ^в	н.и.	н.и.	1.66	2.01
	3	0.30	593±20	44.2	55.0	2257	7.51	2219	405	85	113	4.5	1.74
R 4.6	1	1.27	518±22	64.5	34.8	~5000	7.63	44	6	н.о.	н.о.	1.46	1.65
	2	1.32	540±83	61.6	37.6	4913	7.56	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	0.72	1.63
	3	0.27	534±92	51.7	47.7	3586	7.21	5577	640	182	169	8.78	1.62
R 4.8	1	0.51	337±44	58.2	40.2	900	7.65	38	25	2	н.о.	0.47	1.20
	2	0.57	380±46	58.5	40.6	810	7.35	30	1	н.о.	н.о.	0.14	0.94
	3	0.57	383±9	60.3	39.2	456	7.30	63	11	3	3	0.45	0.80
R 4.13	1	0.98	400±40	58.7	40.2	3450	7.63	102	31	2	3	1.49	1.20
	2	0.85	360±30	59.8	38.7	2216	7.50	102	21	2	н.о.	1.9	1.24
	3	0.80	330±50	55.6	42.9	2145	7.61	871	126	6	3	1.8	1.16
R 4.14	1	0.98	400±30	59.3	39.8	4183	7.66	71	14	2	2	1.42	1.22
	2	0.90	380±40	58.4	40.2	1928	7.53	250	38	3	2	1.66	1.28
	3	0.88	370±50	56.7	42.1	2092	7.58	445	38	2	н.о.	1.43	1.31
R 4.15	1	0.95	390±40	58.1	41.1	~5000	7.75	52	7	2	3	1.54	1.47
	2	0.89	390±20	59.3	39.2	2234	7.56	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	1.28	1.39
	3	0.89	390±50	56.8	42.6	2373	7.74	383	28	1	н.о.	1.37	1.26
R 4.16	1	0.99	410±30	58.6	40.6	4558	7.76	68	16	3	9	1.51	1.54
	2	0.87	380±30	59.0	40.1	2056	7.54	145	12	н.о.	н.о.	1.53	1.36
	3	0.89	390±50	57.2	41.5	3155	7.61	357	36	2	н.о.	1.37	1.27
R 4.17	1	1.43	715±17	51.5	47.5	1855	7.63	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	1.54	н.и.
	2	1.41	588±42	52.6	47.0	3583	7.47	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	6.97	н.и.
	3	1.77	708±18	54.6	44.6	2578	7.64	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	2.30	н.и.
R 4.19	1	0.91	491±7	64.6	34.4	3416	7.78	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	2.64	3.22
	2	0.97	483±20	63.2	36.0	2398	7.75	595	11	4	4	2.91	3.22
	3	1.04	475±8	62.4	36.6	2079	7.78	1394	154	17	11	3.55	3.72
R 4.20	1	0.90	486±13	64.4	34.6	2633	7.72	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	2.36	3.22
	2	0.93	464±18	64.0	35.2	2530	7.71	755	20	5	5	3.15	3.36
	3	0.99	450±9	63.5	34.9	37	7.78	630	66	3	5	2.51	3.76

^a Параметры работы реакторов представлены в трех точках отбора проб, когда микробные сообщества были проанализированы; ^б не обнаружены; ^в не исследованы.

Реактор R 4.5, утилизирувавший навоз КРС в качестве единственного субстрата, производил меньшее количество биогаза в сравнении с реактором R 4.6, в котором совместному анаэробному разложению подвергали навоз КРС и послеспиртовую барду (DDGS). Тем не менее в обоих реакторах получали наиболее высокий удельный выход биогаза в сравнении с R 3.1 при сопоставимой нагрузке по органике 2.42 и 2.45 г_{ОСВ}·л⁻¹сут⁻¹ соответственно (вторая точка). Между второй и третьей точками отбора проб температуру в реакторах постепенно увеличивали с 39°C до 55°C, что сопровождалось накоплением ЛЖК. Переход на термофильные условия приводил к более высокому выходу биогаза с пониженным содержания метана (Таблицы 1 и 2).

Анаэробную конверсию навоза КРС и силоса кукурузы низкого качества проводили в реакторах R 4.8 и R 4.17. Реактор R 4.17 достиг наивысшего удельного выхода биогаза 715 мл·г⁻¹_{ОСВ} в первой точке отбора проб. В этот реактор кукурузный силос вносили в большем количестве по сравнению с реактором R 4.8, что могло стать причиной более высокого выхода биогаза. Однако реактор R 4.8 вырабатывал биогаз с более высоким содержанием метана 58-60%. Концентрация образовавшихся органических кислот в R 4.8 была значительно ниже таковой в R 4.17, что указывает на более эффективное их вливание в метаногенез в данном реакторе (Таблицы 1 и 2).

В реакторах R 4.13 и R 4.14 проводили совместную обработку навоза КРС и соломы кукурузы, а в реакторах R 4.15 и R 4.16 – навоза КРС и экструдированной соломы кукурузы. Статистически значимых различий в отношении удельного выхода биогаза (в диапазоне от 330 до 410 мл·г⁻¹_{ОСВ}) или содержания метана во всех 4-х реакторах не наблюдали (Таблицы 1 и 2).

В реакторах R 4.19 и R 4.20 анаэробной конверсии подвергали жмых семян растения *Jatropha* с постепенным увеличением нагрузки по органике с 1.84 до 2.2 г_{ОСВ}·л⁻¹сут⁻¹. Одновременно удельный выход биогаза снижался с 491 до 475 мл·г⁻¹_{ОСВ} и с 486 до 450 мл·г⁻¹_{ОСВ} соответственно. По сравнению с другими субстратами жмых семян *Jatropha* производил биогаз с более высоким содержанием метана ~63-65%. Концентрация ионов аммония в реакторах была довольно высокой (до 3.76 г·л⁻¹ аммонийного азота) (Таблицы 1 и 2).

В заключение, R 4.6, утилизирувавший навоз КРС и DDGS, а также R 4.17, утилизирувавший навоз и кукурузный силос низкого качества, давали самую высокую выработку биогаза. Концентрации ионов аммония были благоприятными для метаногенеза, за исключением реакторов, субстратом для которых служил куриный помет или жмых семян *Jatropha*. Известно, что NH₄⁺-N в концентрации от 1.7 до 14 г·л⁻¹ ингибирует активность метаноархей в реакторах (Chen et al., 2008). Таким образом, частичное ингибирование метаногенеза можно предположить в R 3.1, а также и в R 4.19 и R 4.20.

1.2 Структура бактериального сообщества

Бактериальное разнообразие в 11 реакторах было исследовано методом пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК. В общей сложности, 144 092 высококачественных отфильтрованных рида было получено из библиотеки ампликонов, включавшей 13 образцов (образцы второй точки каждого реактора, а

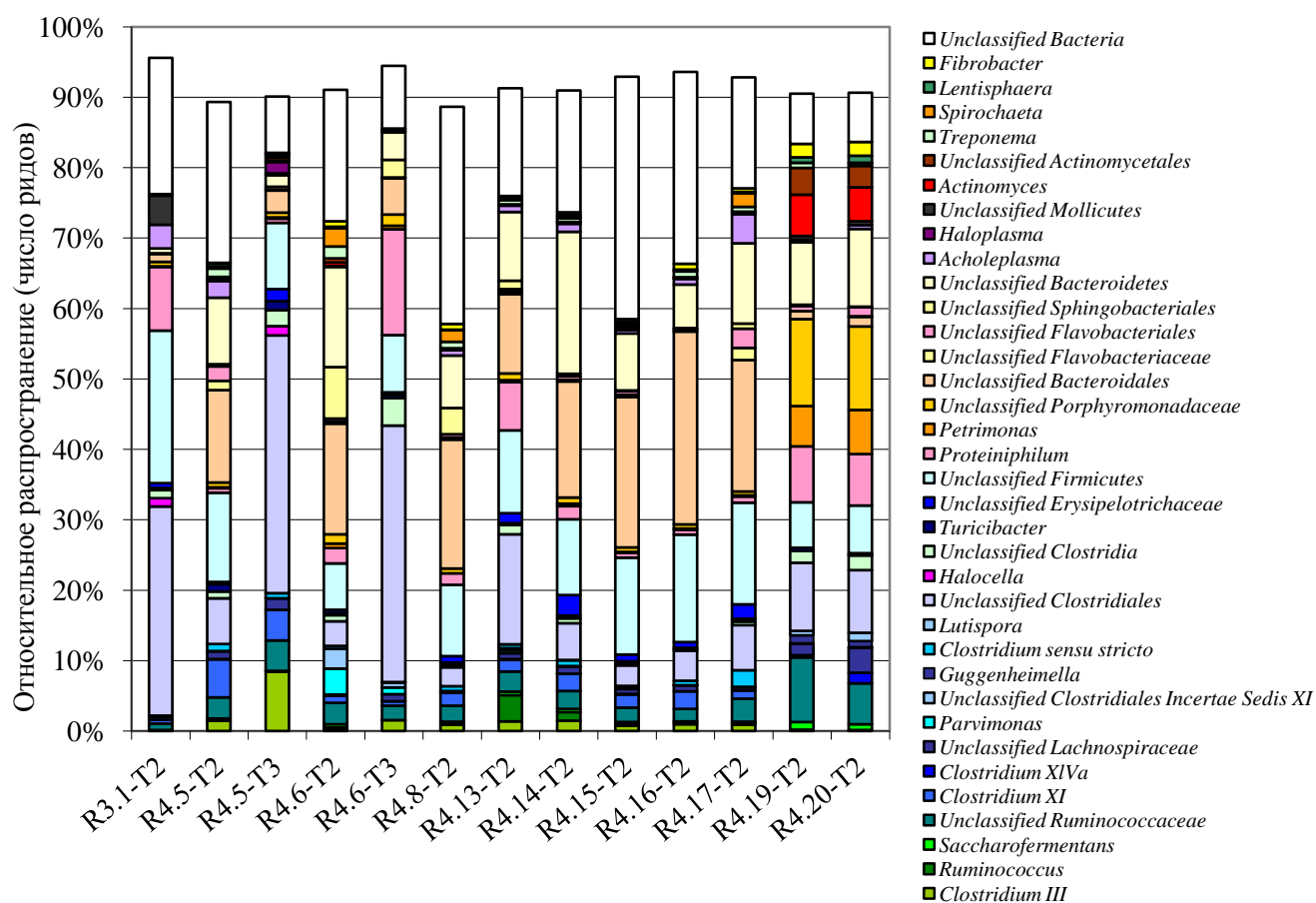


Рисунок 1 – Структура бактериального сообщества в 11 реакторах на основе данных, полученных методом пиросеквенирования бактериальных 16S рРНК ампликонов.

также образцы третьей точки из реакторов R 4.5 и R 4.6). Применяв RDP классификатор, 141 994 рида были отнесены к последовательностям бактериальных генов 16S рРНК. Число родов для каждого образца составило от 5 115 до 20 056. На рисунке 1 продемонстрировано относительное распределение групп бактерий с процентом встречаемости более 1%. В зависимости от исследованного образца, от 7 до 34% последовательностей не были отнесены ни к одной из известных фил (unclassified Bacteria).

Наиболее обильными филами во всех реакторах оказались неизвестные Firmicutes (23-79%) и Bacteroidetes (8-44%), среди которых Clostridia (11-50%) и Bacteroidia (5-30%) были основными классами соответственно. Следующими филами, присутствовавшими во всех реакторах, были Tenericutes (0.2-8%), Actinobacteria (0.2-10%), Proteobacteria (0.2-3%), Spirochaetes (0.2-5%), Lentisphaerae (0.01-5%) и Synergistetes (менее 1%). Другие филы как Chloroflexi, Fibrobacteres, Planctomycetes, Acidobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Thermotogae и кандидаты на подразделение OD1, TM7 и SR1 присутствовали в большинстве образцов, но в незначительных количествах (Рисунок 1).

Отличительный состав бактериального сообщества был обнаружен в реакторе R 3.1, субстратом для которого служил куриный помет и навоз, а также в реакторах R 4.19 и R 4.20, в которых анаэробной конверсии подвергали жмых семян Jatropha. Содержимое реактора R 3.1 было представлено в основном неизвестными Clostridiales и неизвестными Firmicutes, а также представителями

рода *Proteiniphilum* (фила *Bacteroidetes*). Кроме того, роды *Halocella* и *Acholeplasma*, а также неизвестные *Mollicutes* выделялись. Структура бактериальных сообществ в обоих реакторах R 4.19 и R 4.20 была схожей, однако отличалась от структуры сообществ, обнаруженных в других реакторах. Так, в сравнении с другими реакторами, в R 4.19 и R 4.20 была зафиксирована высокая численность бактерий родов *Actinomyces*, *Petrimonas*, *Fibrobacter* и *Lentisphaera*. Повышение температуры с 38°C до 55°C в двух других реакторах – R 4.5 и R 4.6 – приводило к снижению некоторых фило типов *Bacteroidetes* и увеличению неизвестных *Clostridiales*.

Разнообразный состав бактериальных ассоциаций реакторов R 3.1, R 4.19 и R 4.20, а также двух реакторов, функционировавших при 55°C, также отчетливо наблюдается на NMDS диаграмме (Рисунок 2). T-RFLP профили трех образцов, отобранных из R 3.1, образуют кластер отдельно от всех других образцов. Реакторы, в которых анаэробной конверсии подвергали жмых семян *Jatropha*, также образуют отдельный кластер. Корреляционный анализ показал, что, помимо концентрации ионов аммония, вторым решающим параметром, оказавшим влияние на структуру бактериального сообщества в реакторе R 3.1, стали высокие концентрации уксусной и изомасляной кислот ($p < 0.01$), а также пропионовой и масляной кислот ($p < 0.05$). Профили бактериальных сообществ реакторов R 4.19 и R 4.20 показали аналогичную корреляцию с данными параметрами анаэробного процесса, однако явно отличались от бактериальных профилей реактора R 3.1. Профили бактериальных сообществ во всех других образцах были относительно похожи за исключением двух образцов из реакторов R 4.5 и R 4.6, которые были отобраны после перехода к термофильному режиму конверсии сырья. Сдвиги бактериального сообщества в этих реакторах сильно коррелировали с температурой. T-RFLP профили в образцах из реакторов R 4.13 и R 4.14 были относительно разбросаны в пределах NMDS диаграммы, что указывает на высокую изменчивость бактериальных ассоциаций в данных биогазовых реакторах (Рисунок 2).

1.3 Структура и динамика развития архейного сообщества

Структуру архейных ассоциаций в 11 реакторах изучали путем построения библиотеки клонов гена 16S рРНК в трех точках отбора проб с интервалом отбора в один месяц. В общей сложности 1440 клонов подвергли скринингу при помощи ПЦР с использованием вектор-специфичных праймеров и рестрикционного анализа. Далее из клонотеки отобрали 69 репрезентативных клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. На основании результатов, полученных RDP классификатором, а также на основании длин T-RF, были определены 17 операционных таксономических единиц (ОТЕ). Так, представители фило *Euryarchaeota* доминировали во всех реакторах (16 ОТЕ), среди них 14 фило типов принадлежали метаногенным археям. 7 ОТЕ принадлежали к гидрогенотрофному порядку *Methanomicrobiales*, и 7 ОТЕ были отнесены к ацетокластическим / метилотрофным / гидрогенотрофным *Methanosarcinales*. Кроме метаногенов, 2 ОТЕ были отнесены к порядку *Thermoplasmatales* (фила *Euryarchaeota*) и 1 ОТЕ была отнесена к классу *Thermoprotei* (фила *Crenarchaeota*).

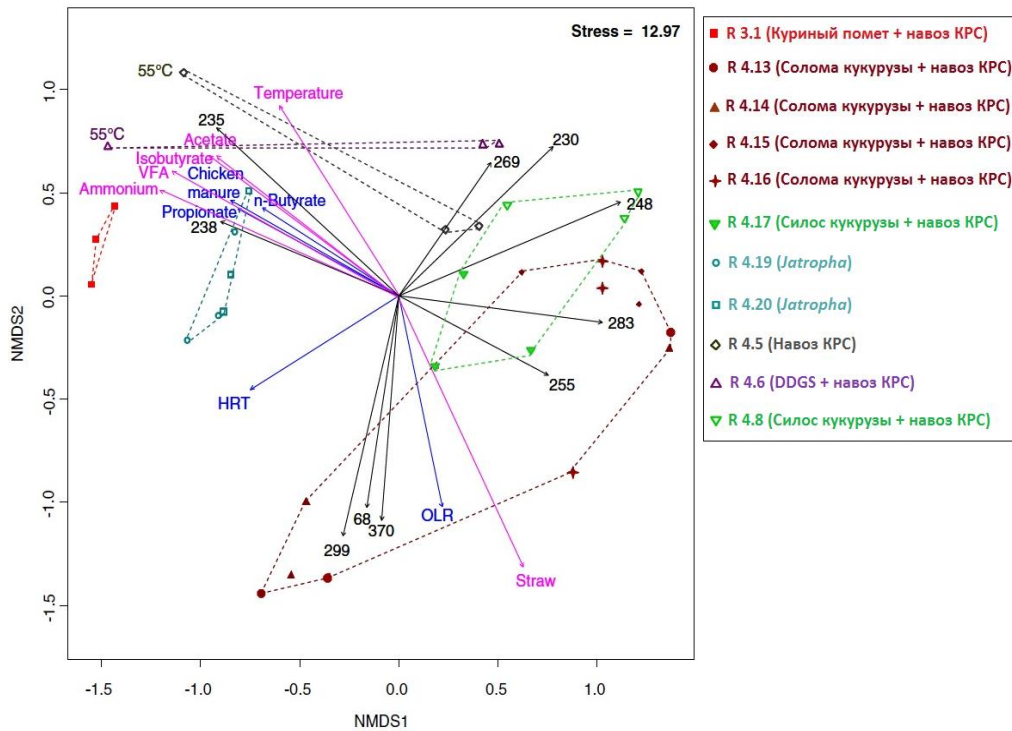


Рисунок 2 – NMDS диаграмма T-RFLP профилей бактериальных 16S рНК ампликонов после их расщепления ферментом рестрикции HaeIII. Сходство сообщества основано на применении индекса Брея-Кёртиса. Стрелки пурпурного цвета – корреляционные векторы разнообразия бактериального сообщества и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов $p < 0.01$. Синие стрелки – корреляционные векторы разнообразия бактериального сообщества и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов $0.01 < p < 0.05$. Стрелки черного цвета – корреляционные векторы отдельных T-RF и параметров процесса со значимостью факторов $p < 0.01$.

На рисунке 3 представлена динамика развития архейного сообщества в 11 реакторах в соответствии с T-RFLP профилями архейных 16S рНК ампликонов после их обработки ферментом рестрикции MseI. Интересно, что почти все идентифицированные нуклеотидные последовательности имели высокую степень гомологии с некультивируемыми археями (96-100%).

Архейное сообщество в реакторе R 3.1 отличалось наименьшим разнообразием в сравнении с другими реакторами. Архейное сообщество было представлено двумя флотипами гидрогенотрофного рода *Methanoculleus* (T-RF 36-39 и T-RF 499) (Рисунок 3). T-RFLP профили трех образцов реактора R 3.1 образуют отдельный кластер на NMDS диаграмме, что подчеркивает особенность структуры сообщества в данном реакторе (Рисунок 4). Оба флотипа были обнаружены во всех 11 реакторах, но в разном количестве, что означает их ключевую роль в гидрогенотрофном метаногенезе в данных реакторах.

Преобладающими в сообществе всех 4 реакторов (R 4.13, R 4.14, R 4.15 и R 4.16) оказались метаноархеи рода *Methanosarcina*, представленные T-RF 859-860. Следующая ОТЕ этого рода, представленная T-RF 557-559, была широко распространена в реакторах R 4.19 и R 4.20. В этих реакторах данная группа метаногенов была второй по численности после представителей рода *Methanoculleus* (Рисунок 3). T-RF 859-860, отнесенный к роду *Methanosarcina*, также был преобладающим в R 4.5. Так, частота встречаемости T-RF 859-860 во

втором образце достигла 89% от общих T-RF-площадей пиков, однако повышение температуры до 55°C сопровождалось снижением частоты встречаемости данного филотипа до 54% и одновременным повышением *Methanoculleus* spp. (T-RF 36-39 и T-RF 499). В образцах из R 4.6 доминирующими представителями оказались метаногены ацетокластического рода *Methanosaeta* с T-RF 553 и T-RF 853-854. Однако смена на термофильный режим сопровождалась исчезновением *Methanosaeta* sp. и появлением *Methanosarcina* sp. (T-RF 860), частота встречаемости которой достигла 71% (Рисунок 3).

Архейное сообщество в реакторе R 4.8 характеризовалось как относительно стабильное и было представлено членами *Methanosaeta* (T-RF 553 и T-RF 853-854) и *Methanoculleus* (T-RF 36-39 и T-RF 499). Напротив, архейное сообщество в реакторе R 4.17 было нестабильным в связи с увеличением вносимой органики с 2.0 до 2.5 г_{ОСВ}·л⁻¹сут⁻¹ и изменением времени удерживания субстрата (Рисунок 3).

Различный состав архейных ассоциаций реактора R 3.1 также отчетливо наблюдается на NMDS диаграмме (Рисунок 4). Сильная корреляция структуры архейного сообщества от концентрации ионов аммония и субстрата (куриный помет) была обнаружена в R 3.1. Корреляционные векторы на NMDS диаграмме также указывают на ключевую роль гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoculleus* (T-RF 36-39 и T-RF 499) в продукции биогаза из куриного помета. Кроме куриного помета, солома кукурузы как субстрат показала значительную корреляцию с профилями архейных сообществ. Корреляционный анализ также показал, что, помимо высокой температуры, другими решающими факторами, оказавшими влияние на структуру архейного сообщества в R 4.5 и R 4.6, стали выход биогаза и концентрация CO₂ в биогазе (Рисунок 4).

1.4 Структура и динамика развития метаногенного сообщества

Оценку разнообразия метаногенных архей в 11 реакторах осуществляли путем построения библиотеки клонов гена *mcrA* в трех точках отбора проб. Ген *mcrA* кодирует α-субъединицу метил-коэнзим М редуктазы и является метаболическим маркером метаногенеза (Steinberg, Regan, 2008). Скрининг 960 клонов гена *mcrA* при помощи ПЦР с использованием вектор-специфичных праймеров и рестрикционного анализа позволил определить 16 различных филотипов (ОТЕ) в 11 реакторах. Из клонотеки отбирали 47 репрезентативных клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. Метаногенное разнообразие на основе анализа гена *mcrA* сравнивали с данными, полученными после анализа гена 16S рПНК архей. В принципе, хорошие результаты были получены с применением обоих подходов, однако среди клонированных фрагментов гена 16S рПНК отсутствовали представители семейства *Methanobacteriaceae*, и гены *mcrA* охватывали более широкий спектр метаногенов. В соответствии с *mcrA* генами, 9 ОТЕ принадлежали *Methanomicrobiales*, 4 ОТЕ были отнесены к *Methanosarcinales*, и 3 ОТЕ принадлежали *Methanobacteriaceae*. На рисунке 5 представлена динамика развития метаногенов в 11 реакторах в соответствии с T-RFLP профилями *mcrA* ампликонов после их обработки HaeIII.

Структура метаногенного сообщества в реакторе R 3.1 на основе анализа последовательностей генов *mcrA* и 16S рПНК была схожей. Среди T-RFLP

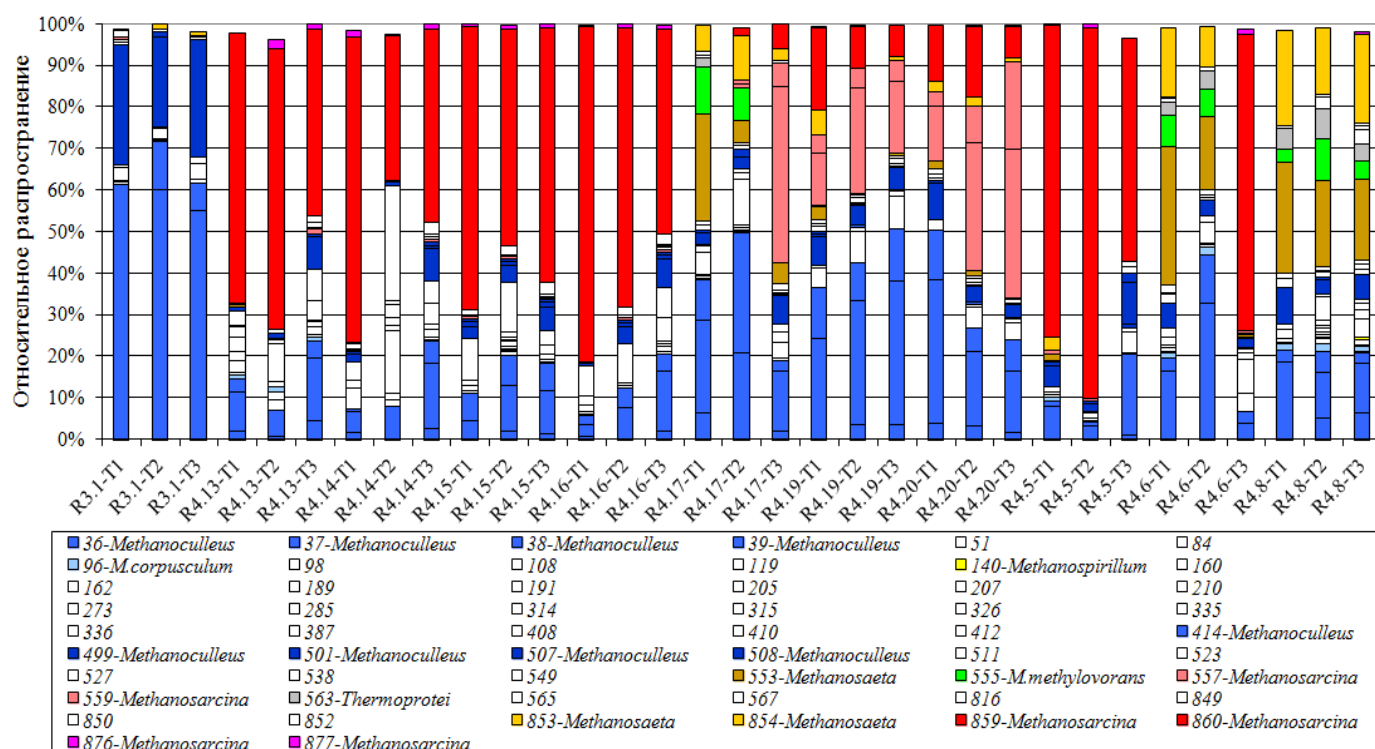


Рисунок 3 – Структура и динамика развития архейного сообщества в 11 реакторах в соответствии с T-RFLP профилями архейных 16S рПНК ампликонов после их расщепления MseI.

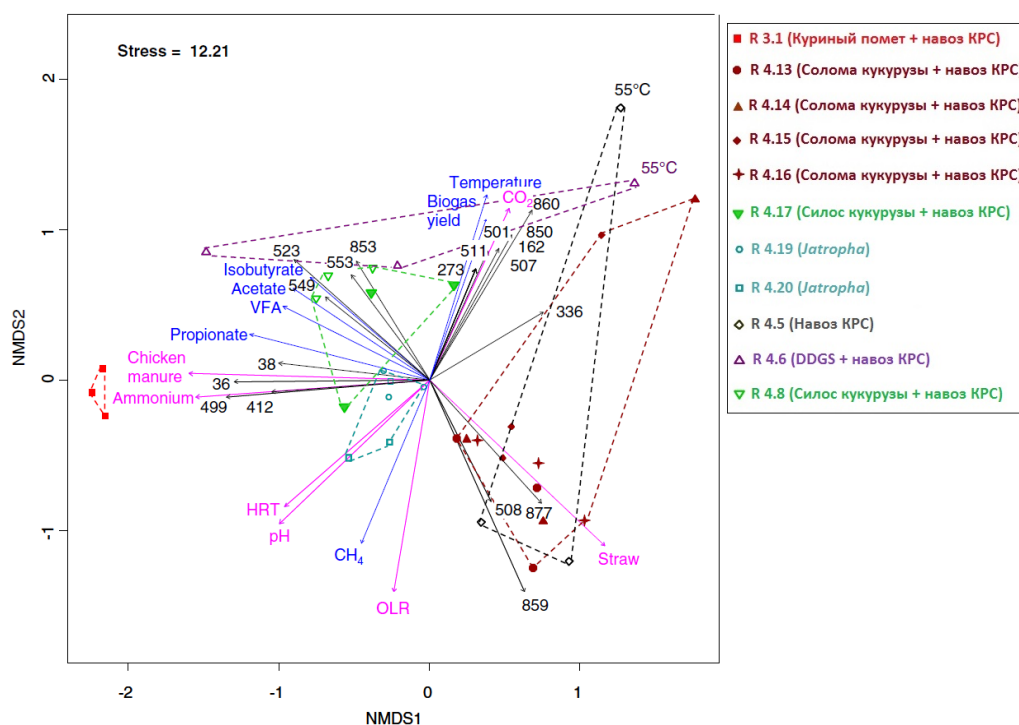


Рисунок 4 – NMDS диаграмма T-RFLP профилей архейных 16S рПНК ампликонов после их обработки ферментом рестрикции MseI. Сходство архейного сообщества основано на применении индекса Брея-Кёртиса. Стрелки пурпурного цвета – корреляционные векторы разнообразия архейного сообщества и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов $p < 0.01$. Синие стрелки – корреляционные векторы разнообразия архейного сообщества и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов $0.01 < p < 0.05$. Стрелки черного цвета – корреляционные векторы отдельных T-RF и параметров процесса со значимостью факторов $p < 0.01$.

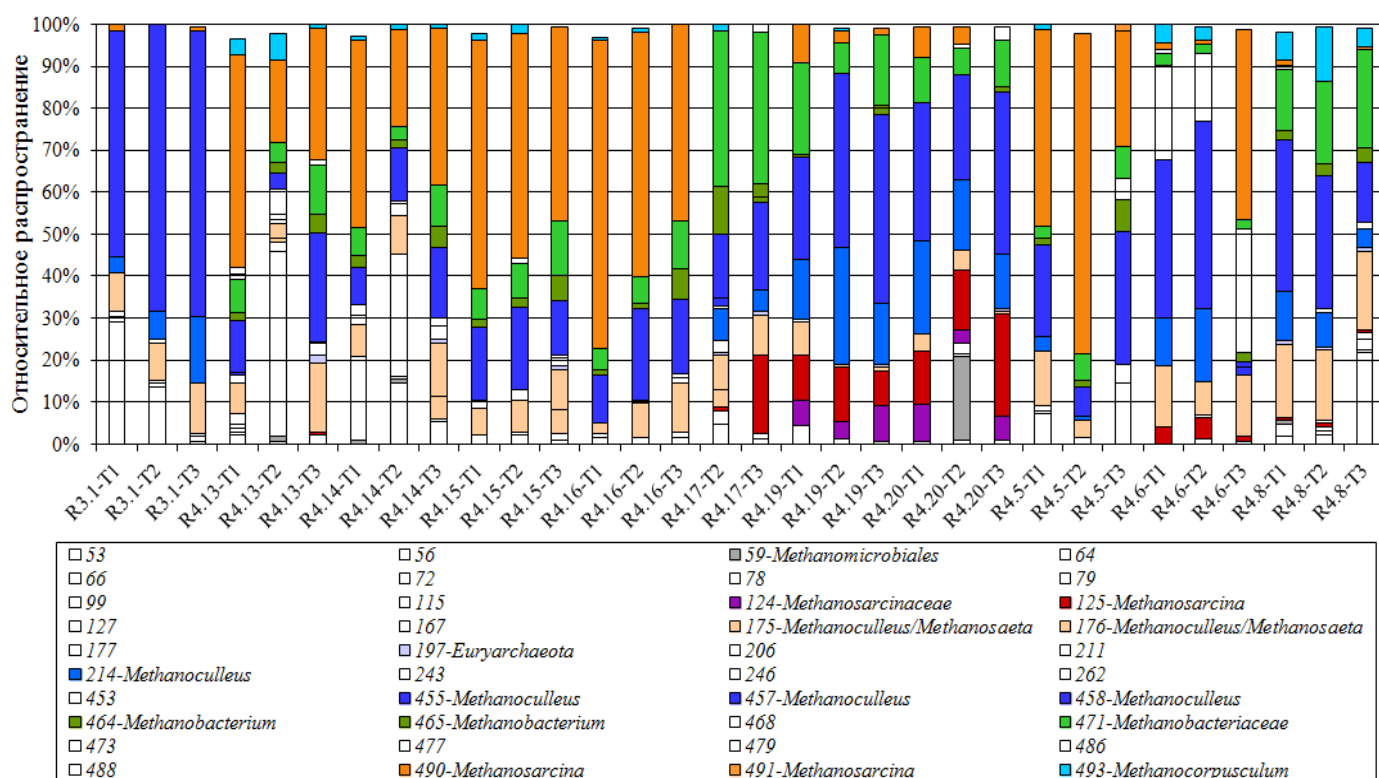


Рисунок 5 – Структура и динамика развития метаногенного сообщества в 11 реакторах в соответствии с T-RFLP профилями *mcrA* ампликонов после их расщепления HaeIII.

профилей *mcrA* гена доминировали три фило типа гидрогенотрофного рода *Methanoculleus* (T-RF 176, T-RF 214 и T-RF 455-458) (Рисунок 5). Метаногены *Methanoculleus* sp., были также широко распространены в R 4.19 и R 4.20. Следующими участниками метаногенеза в данных реакторах оказались представители *Methanobacteriaceae* (T-RF 471) и *Methanosarcinaceae* (T-RF 124, T-RF 125 и T-RF 490). Метод на основе анализа 16S рРНК не позволил выявить членов *Methanobacteriaceae*, тогда как подход на основе анализа гена *mcrA* позволил идентифицировать рода *Methanobacterium* и *Methanobrevibacter* в семействе *Methanobacteriaceae*. Преобладающими организмами в R 4.13, R 4.14, R 4.15 и R 4.16 оказались метаногены рода *Methanosarcina* (T-RF 490). *Methanosarcina* с T-RF 490 также была преобладающей в R 4.5. Однако повышение температуры до 55°C сопровождалось снижением частоты встречаемости данного фило типа. Термофильный режим в R 4.6 приводил к значительному снижению частоты встречаемости метаноархей родов *Methanoculleus* (T-RF 214 и T-RF 457) и появлением *Methanosarcina* sp. (T-RF 490). Метаногенное сообщество в реакторе R 4.8 характеризовалось как относительно стабильное и в основном было представлено *Methanoculleus* (T-RF 214 и 457), *Methanosaeta* (T-RF 176), *Methanobacteriaceae* (T-RF 471) и *Methanocorpusculum* (T-RF 493). Среди мажорных фило типов в реакторе R 4.17 были идентифицированы гидрогенотрофные *Methanobacteriaceae* с T-RF 471 и *Methanoculleus* с T-RF 457 (Рисунок 5).

1.5 Взаимосвязь параметров анаэробного процесса со структурой микробного сообщества

Микробные сообщества в 11 реакторах были исследованы на их филогенетический состав в зависимости от состава используемого субстрата и

параметров анаэробного процесса. Наиболее распространенными бактериальными филами были *Firmicutes* (в основном *Clostridia*) и *Bacteroidetes* (в основном *Bacteroidia*), в то время как среди метаногенных сообществ преобладали метаноархеи филы *Euryarchaeota*, в основном представители порядков *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* и *Methanobacteriales*.

Клостридиальные филоотипы присутствовали во всех 11 реакторах, однако частота их встречаемости варьировала в зависимости от условий анаэробного процесса. Клостридии представляют собой важную группу ферментирующих бактерий, которые обладают способностью производить молекулярный водород (Das, Veziroglu, 2001). Известно, что некоторые виды порядка *Clostridiales* создают целлюлосомы, которые интенсивно участвуют в анаэробной конверсии устойчивой к биоразрушению целлюлозы, поддерживая ацетогенов и метаногенов необходимыми соединениями (Fontes, Gilbert, 2010). Представители семейства *Ruminococcaceae* были обнаружены в значительном количестве в реакторах, утилизовавших солому кукурузы или жмых семян *Jatropha*. Эти ферментирующие бактерии гидролизуют различные полисахариды и способны сбраживать гексозы, а также пентозы (Morrison, Miron, 2000). Соответственно функциональную ролью представителей *Ruminococcaceae* в наших реакторах является разрушение целлюлозы в растительных волокнах. Другие участники анаэробной деструкции растительных волокон, представители родов *Actinomyces* и *Fibrobacter*, по-видимому, также играли роль деструкторов целлюлозы и в реакторах R 4.19 и R 4.20. Подобно семейству *Ruminococcaceae*, представители рода *Fibrobacter* являются целлюлолитическими бактериями (Béra-Maillet et al., 2004). Помимо роли в гидролизе и ацидогенезе, представители класса *Clostridia* также участвуют в ацетогенезе и синтрофном окислении ацетата. Последний путь имеет особое значение в качестве альтернативного удаления ацетата, когда ацетокластический метаногенез подавляется (Schnürer, Nordberg, 2008). Большинство бактерий, участвующих в синтрофном окислении ацетата, относятся к клостридиям (Westerholm et al., 2010; Westerholm et al., 2011), однако их фактическое разнообразие пока не известно. Помимо нескольких клостридиальных филоотипов, представители *Bacteroidetes* были обнаружены в изобилии в наших реакторах. Представителей филы *Bacteroidetes* также обнаруживают и в других реакторах (Krause et al., 2008; Kröber et al., 2009).

В заключение, состав бактериального сообщества в 11 реакторах в основном зависел от субстрата, а также от температуры в 2 реакторах, которая вызывала наиболее выраженные сдвиги в структуре сообщества. После перехода на термофильный режим переработки (55°C) бактериальное сообщество в реакторе R 4.6 развивалось в сходном направлении, что и бактериальные сообщества в реакторах R 3.1, R 4.19 и R 4.20.

Метаногенное сообщество в реакторе R 3.1, в котором анаэробной конверсии с получением биогаза подвергали куриный помет и навоз КРС, почти полностью состояло из гидрогенотрофных метаногенных архей, принадлежавших роду *Methanoculleus*. Метаногены данного рода используют H_2/CO_2 и формиат в качестве метаногенных субстратов (Cheng et al., 2008). Причиной ингибирования ацетокластического метаногенеза, по-видимому, являлась высокая концентрация

ЛЖК (в основном ацетата и пропионата, до $9.9 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и $4.1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно) и $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ (до $5.9 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) (Таблица 2). Таким образом, синтрофное окисление ацетата в качестве основного процесса его поглощения можно предположить в реакторе R 3.1. Преобладание *Methanoculleus* spp. в реакторе R 3.1 означает их способность доминировать и в экстремальных условиях роста. Кроме того, данные метаногены были обнаружены во всех 11 реакторах, что означает их повсеместную основную роль в гидрогенотрофном метаногенезе в биогазовых реакторах.

Следующими мажорными филотипами в наших реакторах оказались представители рода *Methanosarcina*. Они являются ацетокластическими и метилотрофными микроорганизмами, некоторые из них также могут использовать H_2/CO_2 в качестве метаногенных субстратов. Реакторы R 4.19 и R 4.20 работали при повышенных концентрациях ЛЖК (до $3.6 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) и $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ (до $3.8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) по сравнению со всеми другими реакторами, но в более мягких условиях по сравнению с R 3.1 (Таблица 2). По-видимому, повышенные концентрации аммония и ЛЖК в реакторах R 4.19 и R 4.20 стимулировали рост видов рода *Methanosarcina*, а не *Methanosaeta* (Karakashev et al., 2005). Кроме того, из-за высокой концентрации аммония, синтрофное окисление ацетата могло протекать и в этих реакторах. Члены рода *Methanosarcina* были обнаружены как доминирующие метаногены в R 4.13, R 4.14, R 4.15 и R 4.16. Присутствие *Methanosaeta* spp. указывает на протекание строго ацетокластического метаногенеза при низких концентрациях ацетата (Kendall, Boone, 2006), что справедливо для R 4.8 и R 4.6 в мезофильных условиях. Структура метаногенного сообщества, как и бактериального, также коррелировала с температурой. Представители *Methanobacteriaceae* также были обнаружены во всех реакторах, за исключением R 3.1, что означает их потенциальную чувствительность к высоким концентрациям аммония и ЛЖК.

2 Анаэробная деструкция органических отходов спиртового производства в лабораторных установках

2.1 Влияние дополнительно внесенного источника ионов Fe^{3+} на анаэробный процесс

2.1.1 Основные параметры работы анаэробных реакторов

В таблицах 3 и 4 отображены основные биотехнологические параметры анаэробной конверсии барды стандарта DDGS в качестве исходного субстрата. Внесение ионов Fe^{3+} в реакторы сопровождалось удалением H_2S , повышенной продукцией биогаза и более стабильным процессом метангенерации. Причинно-следственная связь становится очевидной при сравнении реакторов R 6.2 и R 6.6, которые эксплуатировались в идентичных режимах за исключением внесения FeCl_3 в последний реактор. Так, удельный выход биогаза из R 6.2 и R 6.6 составил 520 и $610 \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$ соответственно (Таблица 4). Возможно, присутствие высокой концентрации H_2S в первом реакторе оказалось токсичным для бактериальных и метаногенных консорциумов, что могло оказать влияние на активность микроорганизмов. В связи с тем, что в некоторых случаях необходимо проводить предварительную обработку субстрата для повышения эффективности его гидролиза, в нашем случае была применена предварительная обработка исходного субстрата инокулятом из соответствующего реактора. Эксперименты с R 6.5 и R 6.6

Таблица 3 – Параметры функционирования лабораторных биогазовых реакторов, утилизовавших барду стандарта DDGS

Реактор	Объем (л)	Температура (°C)	Нагрузка по органике (г _{ОСВ} ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹)	Сухое вещество (% в DDGS)	Органическое сухое вещество (% в DDGS)	Состав субстрата (г·сут ⁻¹)					Время удерживания (сут)	
						DDGS	H ₂ O	Инокулят	FerroSorp DG	FeCl ₃ (40%)		Сумма (мл·сут ⁻¹)
R 6.2	5.0	38	2	88	81.8	12.24	137.76	-	-	-	150	33.3
R 6.3	5.0	38	5	88	81.8	30.6	168.18	20	1.22	-	220	22.7
R 6.4	5.0	38	2	11	9.8	102.4	46.21	20	-	1.39	170	29.4
R 6.5	5.0	38	2	88	81.8	12.24	136.37	20	-	1.39	170	29.4
R 6.6	5.0	38	2	88	81.8	12.24	136.37	-	-	1.39	150	33.3

Таблица 4 – Основные биотехнологические параметры анаэробной переработки послеспиртовой барды стандарта DDGS

Реактор	Удельный выход биогаза (мл·г ⁻¹ _{ОСВ})	Состав биогаза			pH	Летучие жирные кислоты (мг·л ⁻¹)			Органические кислоты (г·л ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (г·л ⁻¹)
		CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (ppm)		Уксусная	Пропио- новая	Изомас- ляная		
R 6.2	520±18	63.0±0.6	36.1±0.8	4513±71	7.51±0.07	149.5±8.1	64.3±4.4	1.7±0.02	0.94±0.07	1.82±0.09
R 6.3	550±13	64.4±0.6	35.1±0.4	34±4.9	7.68±0.04	70.1±7.2	2.7±0.12	н.о. ^a	1.25±0.11	2.94±0.15
R 6.4	600±14	62.7±0.5	36.6±0.7	264±15	7.17±0.03	0.3±0.1	0.2±0.1	н.о.	0.57±0.05	1.16±0.09
R 6.5	590±7	62.5±0.6	37.1±0.9	50±3.4	7.27±0.02	7.4±1.1	н.о.	н.о.	0.62±0.06	1.76±0.03
R 6.6	610±8	62.3±0.4	37.4±0.3	66±3.5	7.26±0.02	0.3±0.1	н.о.	н.о.	0.58±0.03	1.78±0.04

Показаны средние значения параметров за последние 3 недели работы реакторов (n=21 для продукции, удельного выхода и состава биогаза, n=6 для всех остальных параметров); ^a не обнаружены.

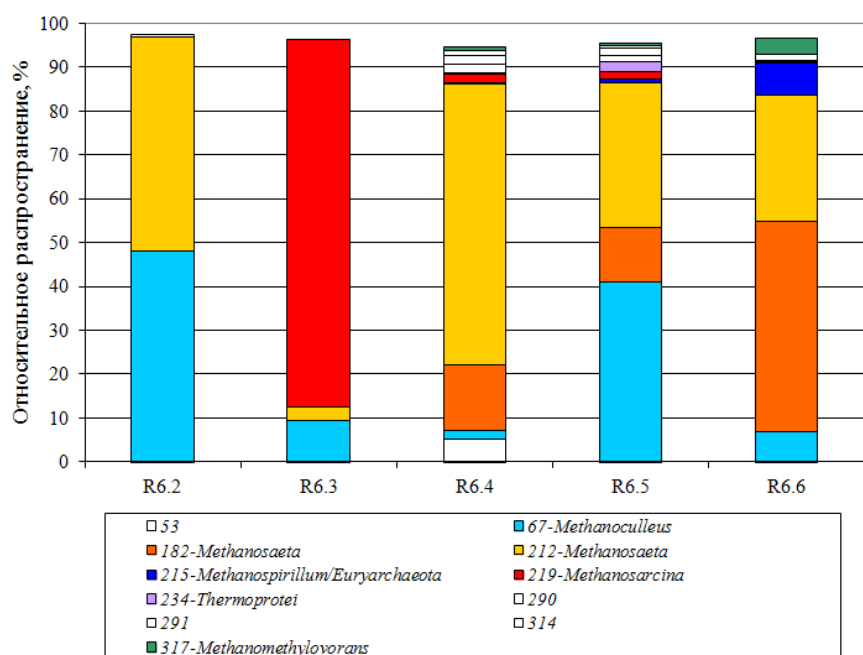
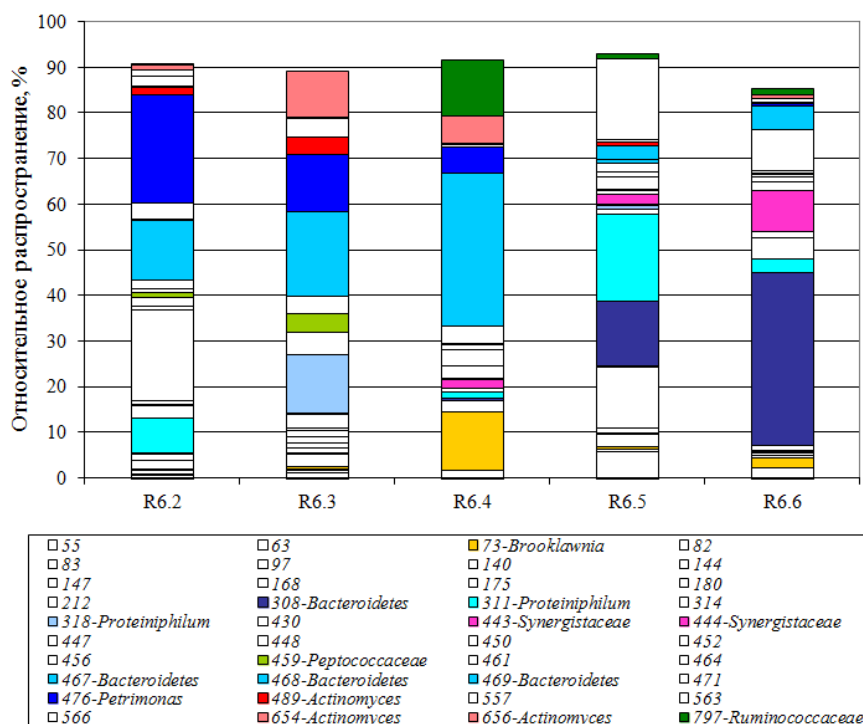
показали, что такая предварительная обработка была малоэффективной, так как удельный выход биогаза из обоих реакторов существенно не различался (590 и 610 мл·г⁻¹_{осв} соответственно) (Таблица 4). Влияние эффекта более высокой нагрузки по органике наблюдали при сравнении параметров реакторов R 6.3 и R 6.5 (Таблицы 3 и 4). Повышенная нагрузка по органике приводила и к образованию большего количества ЛЖК. С целью устранения быстрого снижения pH в данном реакторе использовали железосодержащий FerroSorp DG как добавку для стабилизации pH из-за его основных свойств, а также для осаждения H₂S в форме нетоксичного сульфида железа. R 6.4 был рассмотрен с целью оценки возможности использования жидкой фракции субстрата в качестве сырья для производства биогаза. Сходный удельный выход биогаза из обоих реакторов R 6.4 и R 6.5 (600 и 590 мл·г⁻¹_{осв} соответственно) означает, что жидкая часть барды подходит в качестве сырья для производства биогаза (Таблицы 3 и 4).

2.1.2 Структура бактериального сообщества

T-RFLP фингерпринтинг ампликонов гена 16S рРНК бактерий показал высокое бактериальное разнообразие в 5 реакторах при сильном различии видового состава. Рисунок 6 иллюстрирует результаты T-RFLP анализа, полученные ферментом RsaI. Клонированные ампликоны гена бактериальной 16S рРНК были частично секвенированы, и их T-RF длины подтверждены экспериментально. В общей сложности для секвенирования отбирали 27 клонов из библиотеки, содержащей 960 клонов (192 клон из каждого реактора). Эти клоны были объединены в 13 ОТЕ на основе T-RF и таксономически отнесены к филам *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Synergistetes* и *Proteobacteria* в соответствии с RDP классификатором. Наиболее распространенной и разнообразной группой во всех реакторах была фила *Bacteroidetes* (Рисунок 6). Так, относительная частота встречаемости фило типов данной группы в R 6.2 достигала 45% от общих T-RF-площадей пиков, в R 6.3 – 44%, в R 6.4 – 41%, в R 6.5 – 38%, а в R 6.6 – 47%. В пределах *Bacteroidetes* 5 ОТЕ были обнаружены, среди них 3 ОТЕ были отнесены к семейству *Porphyromonadaceae*. Второй наиболее распространенной группой в R 6.3 и R 6.4 была фила *Actinobacteria* с относительной частотой встречаемости 15 и 19% соответственно. Среди филы *Actinobacteria* были обнаружены бактерии родов *Brooklawnia* и *Actinomyces*. В других реакторах представители актинобактерий были менее распространены. Филадельфия *Firmicutes* в основном состояла из *Peptococcaceae* и *Ruminococcaceae*. Частота встречаемости представителей *Ruminococcaceae* достигала 12% в R 6.4, тогда как в других реакторах клостридиальные формы бактерий были менее распространены. Представители двух других обнаруженных фил – *Synergistetes* и *Proteobacteria* – были обнаружены в меньших пропорциях (Рисунок 6).

2.1.3 Структура архейного сообщества

Археи во всех 5 реакторах были менее разнообразны, нежели бактерии. На рисунке 7 представлено распределение групп архей в ходе анаэробной деструкции DDGS (на основе T-RFLP профилей). В общей сложности 480 клонов (96 из каждого образца) подвергли скринингу при помощи ПЦР и рестрикционного анализа. Далее из клонотеки отобрали 25 клонов для определения их нуклеотидных



последовательностей. На основании результатов, полученных RDP классификатором, а также на основании длин T-RF были определены 9 ОТЕ. Так, представители *Euryarchaeota* доминировали во всех реакторах (8 ОТЕ); 1 ОТЕ была отнесена к *Crenarchaeota*. Гидрогенотрофные метаногены преимущественно были представлены фило типами рода *Methanoculleus* с относительной частотой встречаемости 48 и 41% от общих T-RF-площадей пиков в реакторах R 6.2 и R 6.5 соответственно (Рисунок 7). В других реакторах, этот фило тип был менее распространен. Второй представитель гидрогенотрофных метаногенов – *Methanospirillum* sp. – был обнаружен в значительном количестве только в реакторе R 6.6. Ацетокластические метаногены рода *Methanosaeta* доминировали во всех реакторах (49, 79, 45 и 77% в R 6.2, R 6.4, R 6.5 и R 6.6 соответственно) за

исключением R 6.3. В реакторе R 6.3 доминировали представители *Methanosarcina* sp. с относительной частотой встречаемости 84% (Рисунок 7).

2.1.4 Взаимосвязь параметров анаэробного процесса со структурой микробного сообщества

Бактерии, участвовавшие в анаэробной переработке барды, филогенетически были разнообразны, однако четкая корреляция структуры бактериального сообщества с параметрами работы реакторов отсутствовала. Тем не менее преобладающими фило типами были определены представители *Bacteroidetes*. Бактерии семейства *Porphyromonadaceae* (фила *Bacteroidetes*) продуцируют различные ЛЖК из углеводов или белков. В наших реакторах, утилизировавших DDGS, целлюлолитические клостридии, по-видимому, имели второстепенное значение. Вместо этого, другая группа гидролитических бактерий – преимущественно факультативно анаэробные *Actinomycetales* (Lynd et al., 2002) – оказалась второй наиболее распространенной группой в наших экспериментах. Из полученных результатов следует, что, помимо *Bacteroidetes* и *Clostridia*, представители *Actinobacteria*, играют важную роль в стадиях гидролиза и ацидогенеза при анаэробной утилизации послеспиртовой барды с получением биогаза. Представители недавно признанной филы *Synergistetes* в основном были обнаружены реакторе R 6.6. Все описанные виды в пределах филы *Synergistetes* являются строгими анаэробами, сбразивающими аминокислоты (Jumas-Bilak et al., 2009; Hugenholtz et al., 2009). В протестированных реакторах, вместе с вышеупомянутыми протеолитическими членами семейства *Porphyromonadaceae*, эти бактерии могли использовать пептидные компоненты барды для стадии ацидогенеза. Таким образом, гидролиз и ацидогенез протекал главным образом при участии *Bacteroidetes* совместно с *Actinomycetes*, *Ruminococcaceae* и *Synergistetes* (последняя группа в основном участвовала в стадии ацидогенеза). Кроме того, ацетогенез мог протекать при участии синтрофных представителей *Peptococcaceae*.

Архейное разнообразие было ниже бактериального разнообразия. Реакторы R 6.4, R 6.5 и R 6.6 с внесением FeCl_3 демонстрировали повышенное архейное разнообразие, тогда как в реакторе R 6.2 метаногенное сообщество было представлено двумя основными фило типами – гидрогенотрофным родом *Methanoculleus* и ацетокластическим родом *Methanosaeta*. По-видимому, высокая концентрация токсичного H_2S могла ингибировать метаногены в реакторе R 6.2. В связи с тем, что количество органических кислот в реакторах с высоким разнообразием архей было обнаружено на низком уровне, мы предполагаем, что синтрофные связи между ацетогенными бактериями и ацетокластическими метаногенами были лучше установлены в реакторах R 6.4, R 6.5 и R 6.6. Это способствовало быстрому расщеплению ацетата различными *Methanosarcinales* и повышенной продукции биогаза. Кроме того, внесение микроэлементов вместе с ионами Fe^{3+} , возможно, способствовала повышению активности метаногенов. Напротив, в реакторе R 6.2 наблюдалась аккумуляция пропионата и ацетата, что означает ингибирование бактерий, утилизировавших пропионат, и неэффективное использование ацетата метаногенами, сопровождавшееся низким выходом метана. Представители *Methanosarcina* с T-RF 219 присутствовали в небольших

пропорциях в реакторах с пониженной нагрузкой по органике. Предположительно, *Methanosarcina* sp. в R 6.3 является индикаторным организмом для эффективного и стабильного получения биогаза при высокой нагрузке по органике. Более высокое содержание *Methanosaeta* с T-RF 182 в хорошо функционировавшем реакторе R 6.6 коррелировало с более низким относительным содержанием *Methanosaeta* с T-RF 212 и *Methanoculleus* с T-RF 67. *Thermoplasmatales* (фила *Euryarchaeota*) и *Thermoprotei* (фила *Crenarchaeota*) также были обнаружены в наших экспериментах. В связи с тем, что обнаруженные филотипы только отдаленно относятся к культивируемым видам, сложно сделать заключение об их экофизиологической роли в наших системах.

2.2 Влияние снижения времени удерживания субстрата в реакторах на анаэробный процесс

2.2.1 Основные параметры работы анаэробных реакторов

Одним из наиболее значимых параметров анаэробного процесса является время удерживания (ВУ) субстрата. Оно описывает теоретическое среднее время, которое субстрат проводит в реакторе. Пониженное ВУ желательно для снижения объема реактора и инвестиционных затрат. Иммобилизация микроорганизмов путем гранулирования или прикрепления биопленок на поверхность носителя предотвращает вымывание бактерий и метаногенных архей и позволяет снижать время удерживания (Wilkie et al., 2000).

Стабильность анаэробного процесса, направленного на получение биогаза, может быть оценена измерением концентрации летучих жирных кислот (ЛЖК), которые накапливаются в реакторе, если преобразование образующихся кислот в биогаз нарушено. В последующем pH перерабатываемой биомассы снижается. Уменьшение ВУ до 2 суток в CSTR и FBR и до 3 суток в ASBR вело к снижению значений pH с 7.4 до ~6.8 в трех системах. Такое резкое снижение pH неблагоприятно для большинства метаногенов, в особенности при анаэробной обработке субстрата с высоким содержанием серы (O'Flaherty et al., 1998). Поэтому во всех трех экспериментах было решено повысить pH путем добавления буферных растворов. Добавление буферных растворов стабилизировало pH на уровне значений выше 7, однако прекращение внесения буферных растворов вело к снижению pH в CSTR и ASBR до значений 4.9 и 5.3 соответственно, в то время как pH в FBR оставался стабильным на уровне 6.8. Ацидификация в реакторе ASBR в основном была обусловлена накоплением пропионовой и уксусной кислот. В реакторе CSTR также наблюдалось увеличение ЛЖК, но в меньшей концентрации. Концентрация ЛЖК в реакторе FBR оставалась относительно стабильной. Концентрация $\text{NH}_4^+\text{-N}$ во всех реакторах снизилась с $\sim 1.3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ от начала эксперимента до 0.4, 0.6 и $1.0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ в реакторах FBR, CSTR и ASBR до внесения буферных растворов. После применения NH_4HCO_3 и $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ для стабилизации pH количество $\text{NH}_4^+\text{-N}$ в реакторах повысилось до значений от 1 до $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. В начале эксперимента выход биогаза во всех 3 реакторах был примерно на одном уровне со значениями между 550 и $620 \text{ л} \cdot \text{кг}^{-1}_{\text{осв}}$. Когда ВУ было снижено до 3 и 2 суток, выход биогаза в ASBR и CSTR быстро падал из-за дисбаланса процессов в реакторах. Тем не менее выход биогаза из FBR оставался относительно стабильным

и держался на уровне $\sim 460 \text{ л} \cdot \text{кг}^{-1}_{\text{осв}}$. Полученный результат указывает на положительный эффект иммобилизации метаногенов на носителях в реакторе FBR, на их меньшее вымывание из FBR и на лучшую стабильность анаэробного процесса в FBR по сравнению с другими системами. В стабильных условиях содержание метана варьировало в диапазоне от 56 до 58% и было сопоставимо во всех системах.

2.2.2 Структура и динамика развития водород-продуцирующего бактериального сообщества

В данной работе структура и динамика развития микробного сообщества была отслежена на РНК-уровне. Оценку разнообразия H_2 -продуцирующих сообществ в 3 реакторах осуществляли путем построения библиотеки клонов гена *hydA*. Скрининг 576 клонов гена *hydA* при помощи ПЦР и рестрикционного анализа позволил определить 20 различных филофитов (ОТЕ) в реакторах. Из клонотеки отбирали 30 клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. Эти клоны таксономически были отнесены к бактериальным филумам *Firmicutes* (13 ОТЕ), *Bacteroidetes* (4 ОТЕ), *Spirochaetes* (2 ОТЕ) и *Proteobacteria* (1 ОТЕ) в соответствии с BLASTX анализом. На рисунке 8 представлено распределение H_2 -продуцирующих бактерий в ходе деструкции барды в 3 системах. Это распределение получено на основе T-RFLP профилей MspI-рестрикции. Интересно, что все идентифицированные нуклеотидные последовательности имели низкую степень гомологии с культивируемыми бактериями (процент гомологии 56-88%).

Как видно из рисунка 8А, наиболее распространенной и разнообразной филогенетической группой в реакторе CSTR оказался порядок *Clostridiales* (*Firmicutes*). Так, относительная частота встречаемости филофитов данной группы в CSTR достигала 80% от общей площади T-RF пиков при ВУ субстрата 4 суток. Среди водород-продуцирующих бактерий клостридиальные филофиты с T-RF 87-90 и T-RF 208-210 доминировали в данных условиях. Дальнейшее снижение ВУ и внесение буферных растворов для стабилизации pH сопровождалось уменьшением количества представителей *Clostridiales* и увеличением содержания *Spirochaetales*. После прекращения внесения буферных растворов количество последних достигло 45% (Рисунок 8А). В реакторах FBR и ASBR образцы на анализ микробного состава отбирали с нижней и верхней части реакторов. Водород-продуцирующее бактериальное сообщество в реакторе FBR было относительно стабильным даже при его функционировании при ВУ 3 суток (Рисунок 8Б). Среди H_2 -продуцирующих бактерий в данном реакторе клостридиальные филофиты с T-RF 87-90 доминировали на протяжении 107 суток. Как и в случае с CSTR, снижение ВУ в FBR до 2 суток и внесение буферных растворов для стабилизации pH вели к уменьшению количества представителей *Clostridiales* и увеличению содержания *Spirochaetales*. Дальнейшее снижение ВУ до 1.5 суток и прекращение внесения буферных растворов сопровождалось появлением неидентифицированных представителей (Рисунок 8Б). Структура H_2 -продуцирующего бактериального консорциума в менее эффективном ASBR также была представлена схожими филогенетическими группами, как и в двух других реакторах (Рисунок 8В).

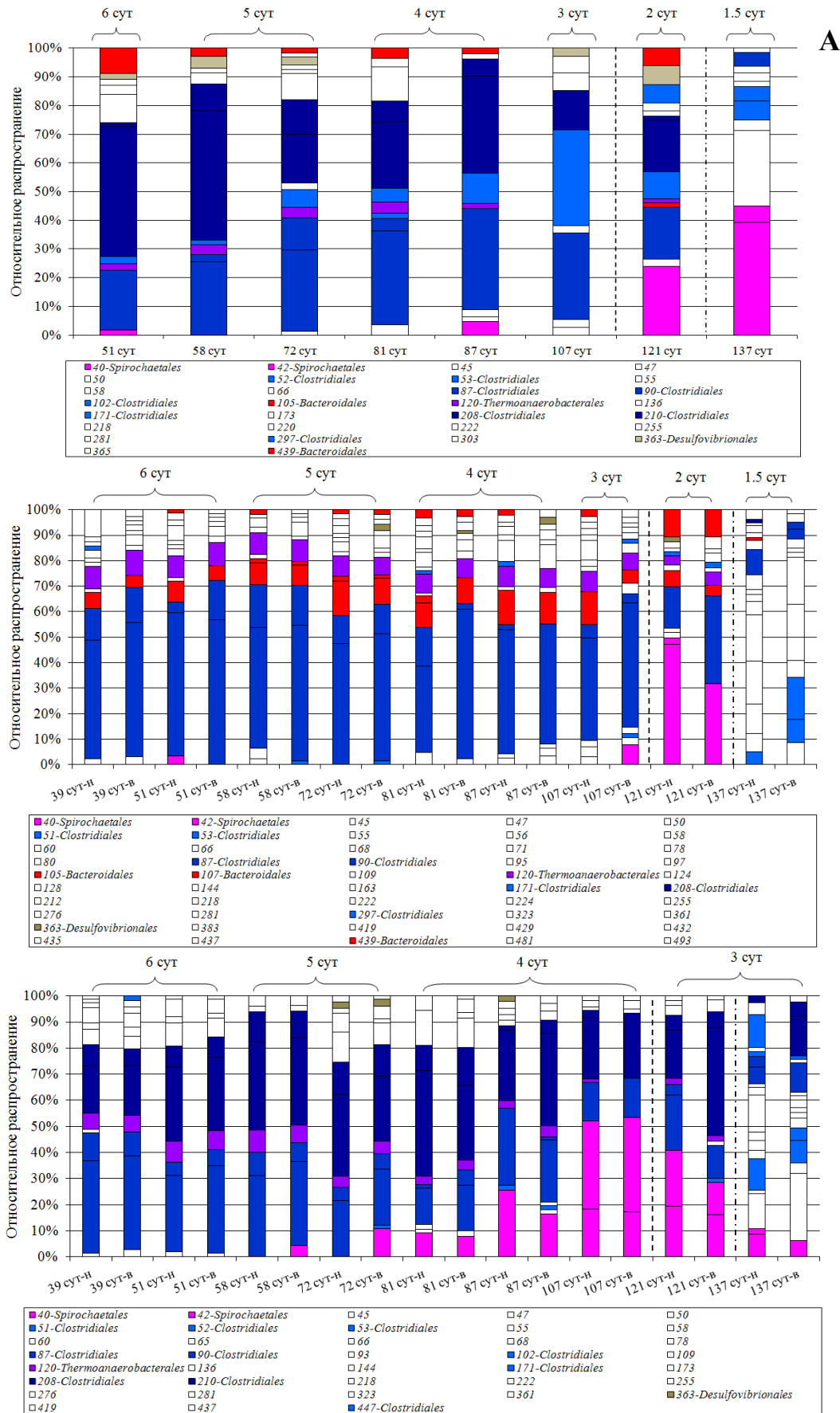


Рисунок 8 – Структура и динамика развития бактериального сообщества в реакторах CSTR (А), FBR (Б) и ASBR (В) в соответствии с T-RFLP профилями *hydA* ампликонов после их расщепления MspI. Пунктирными линиями показано время начала и прекращения внесения буферных растворов.

2.2.3 Структура и динамика развития архейного сообщества

Из клонотеки отбирали 10 репрезентативных клонов 16S рНК архей для определения их нуклеотидных последовательностей. На рисунке 9 показано распределение архей на основе T-RFLP профилей MseI-рестрикции. В реакторе CSTR в первой точке отбора проб архейное сообщество в основном состояло из H₂-утилизирующих *Methanoculleus* sp., что составило 45% от общей площади T-RF пиков, а также ацетокластических, метилотрофных и гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanosarcina* при относительном их распространении 46% (Рисунок 9А). Снижение ВУ с 6 до 5, 4, 3, 2, а затем до 1.5 суток в CSTR оказало влияние на структуру архейного сообщества. В конце эксперимента (137 сутки) метаногены рода *Methanoculleus* начали доминировать и достигли 57%, а доля представителей рода *Methanosarcina* снизилась до 16%. Значительное снижение *Methanosarcina* sp. в период внесения буферных растворов также наблюдалось и в ASBR. Интересно, что в последней пробе реактора CSTR относительное распространение строго ацетокластических метаногенов рода *Methanosaeta* повысилось до 15%. Анализ проб, отобранных из реактора FBR, показал в них присутствие метаногенов родов *Methanosaeta*, *Methanospirillum* и *Methanoculleus* (Рисунок 9Б). Микроорганизмы, отнесенные к роду *Methanosarcina*, отсутствовали в данном реакторе в течение всего эксперимента. При ВУ 6 суток гидрогенотрофные *Methanoculleus* преобладали в верхней части FBR (45% от общей площади T-RF пиков), в то время как снижение ВУ до 4 суток приводило к доминированию строгих ацетокластических метаногенов *Methanosaeta* sp. Дальнейшее снижение ВУ и внесение буферных растворов в FBR приводили к изменению состава сообщества в сторону преобладания гидрогенотрофных метаногенов. В нижней части реактора представители *Methanosaeta* spp. преобладали в течение всего эксперимента; в пределах *Methanomicrobiales*, *Methanospirillum* spp. доминировали после снижения ВУ ниже 5 суток. Это может быть объяснено различиями в свойствах иммобилизации микроорганизмов на носителях. Независимо от места отбора проб в реакторе ASBR, нуклеотидные последовательности метаногенов в основном принадлежали представителям родов *Methanoculleus* и *Methanosarcina* с доминированием *Methanoculleus* на протяжении всего эксперимента. Метаногены родов *Methanospirillum* и *Methanosaeta* были обнаружены только в низких пропорциях в данном реакторе (Рисунок 9В).

2.2.4 Структура и динамика развития метаногенного сообщества

Метаногенное разнообразие в CSTR, FBR и ASBR на основе анализа гена *mcrA* сравнивали с данными, полученными после анализа гена 16S рНК архей. В общем, хорошие результаты были получены с применением обоих методов, однако среди клонированных фрагментов гена 16S рНК отсутствовали представители *Methanobacteriaceae*, и гены *mcrA* охватывали более широкий спектр метаногенов. Скрининг 384 клонов гена *mcrA* при помощи ПЦР и рестрикционного анализа позволил определить 12 различных флотипов (ОТЕ) в CSTR, FBR и ASBR. Из библиотеки клонов отбирали 12 репрезентативных клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. В соответствии с *mcrA* генами, 8 ОТЕ принадлежали гидрогенотрофному порядку *Methanomicrobiales* (*Methanoculleus*

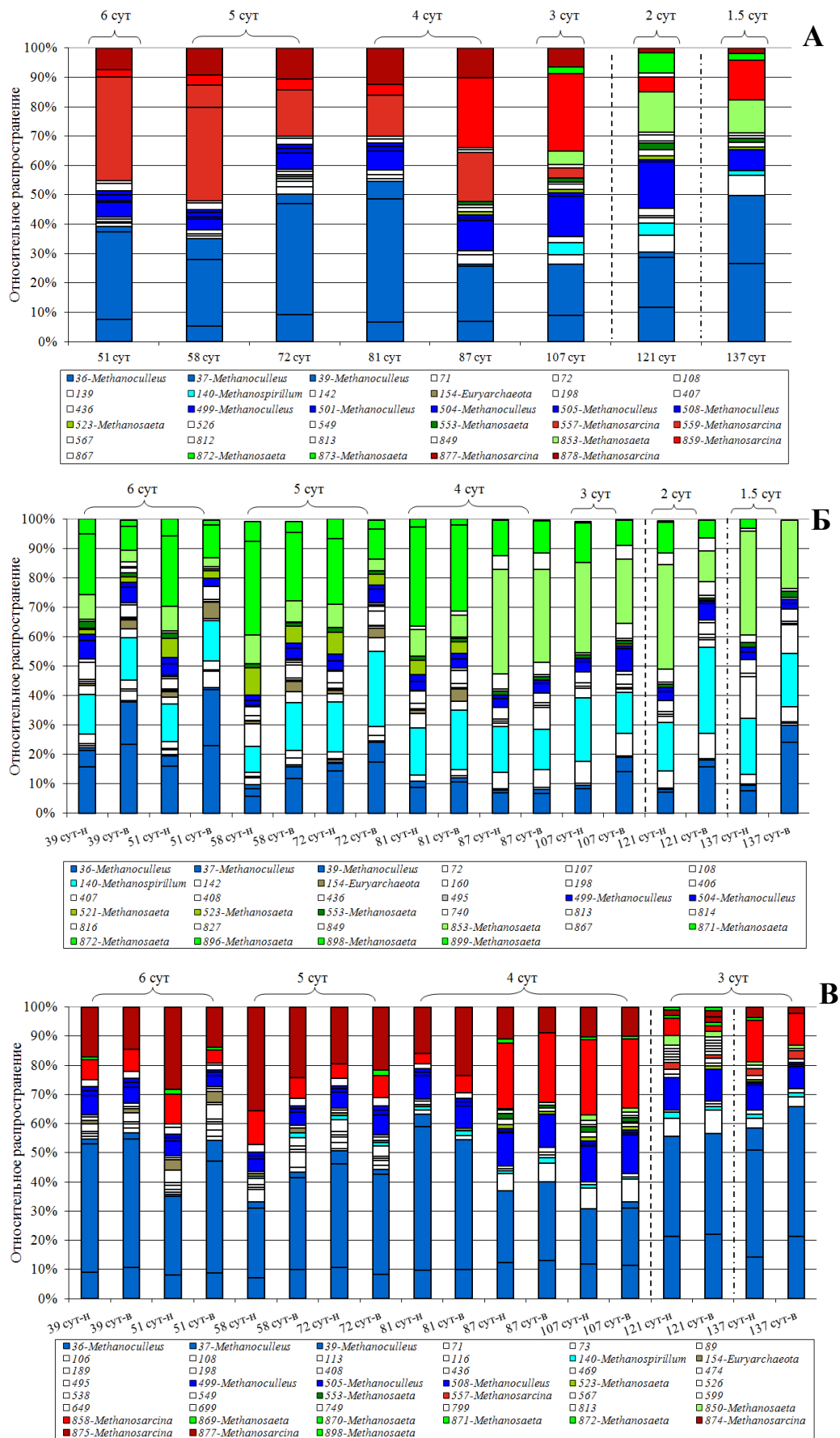


Рисунок 9 – Структура и динамика развития архейного сообщества в реакторах CSTR (А), FBR (Б) и ASBR (В) в соответствии с T-RFLP профилями архейных 16S рРНК ампликонов после их расщепления MseI. Пунктирными линиями показано время начала и прекращения внесения буферных растворов.

sp. и *Methanospirillum* sp.), 1 ОТЕ была отнесена к гидрогенотрофному семейству *Methanobacteriaceae* (*Methanobacterium* sp.) и 3 ОТЕ принадлежали порядку *Methanosarcinales* (*Methanosarcina* sp. и *Methanosaeta* sp.). На рисунке 10 представлена структура и динамика развития метаногенного сообщества в 3 реакторах в соответствии с T-RFLP профилями *mcrA* ампликонов после их обработки MspI. Результаты, полученные на основе анализа гена *mcrA*, в основном были сопоставимы с данными, полученными методом анализа гена 16S рРНК. Кроме этого, метод на основе анализа гена *mcrA* показал присутствие гидрогенотрофных *Methanobacteriaceae* с T-RF 471 в CSTR, FBR и ASBR. Однако их количество никогда не превышало 2% от общей площади T-RF пиков во всех реакторах, что указывает на их незначительное участие в анаэробном процессе деструкции жидкой фракции послеспиртовой барды.

2.2.5 Взаимосвязь параметров анаэробного процесса со структурой микробного сообщества

В заключение, даже в реакторе с непрерывным перемешиванием (CSTR) без иммобилизации микроорганизмов снижение времени удерживания субстрата с 6 до 3 суток не вызывало превышающего вымывания метаногенов, как ранее было постулировано некоторыми авторами. С уменьшением ВУ нестабильность процесса сначала наблюдалась в реакторе ASBR (при ВУ 3 суток), а далее в реакторе CSTR (при ВУ 2 суток). Реактор FBR стабильно функционировал до конца эксперимента, однако снижение ВУ до 1.5 суток вызывало уменьшение удельного выхода биогаза до $\sim 460 \text{ л} \cdot \text{кг}^{-1}_{\text{ОСВ}}$ по сравнению с $\sim 600 \text{ л} \cdot \text{кг}^{-1}_{\text{ОСВ}}$ при ВУ 4-5 суток. Постепенное снижение ВУ вызывало изменения в структуре микробных консорциумов во всех реакторах. Увеличение *Methanosaeta* sp. в CSTR в конце эксперимента, вероятно, связано с их селективным преимуществом даже в реакторе с непрерывным перемешиванием по сравнению с *Methanosarcina* sp., как это было предположено в работе Angenent с сотрудниками (Angenent et al., 2002). Распространенность *Methanosaeta* и *Methanospirillum* в FBR, вероятно, обусловлена их лучшей способностью образовывать биопленки, а также более высокой концентрацией питательных веществ в нижней части реактора из-за восходящего потока поступления субстрата. Однако на состав сообществ, помимо времени генерации микроорганизмов, могли оказать и другие факторы, как внесение буферных растворов, накопление ЛЖК, снижение pH и распределение питательных веществ.

3 Анаэробная конверсия сельскохозяйственных отходов в опытно-промышленном реакторе

3.1 Основные параметры работы анаэробного реактора

Сельскохозяйственный опытно-промышленный биогазовый реактор располагается на животноводческой ферме Буинского муниципального района Республики Татарстан. Это первая опытно-промышленная установка для получения биогаза, построенная в Республике Татарстан в 2010 г. Биогазовый реактор с рабочим объемом 25 м^3 непрерывно снабжают отходами сельского хозяйства, в основном навозом КРС и остаточной растительной биомассой;

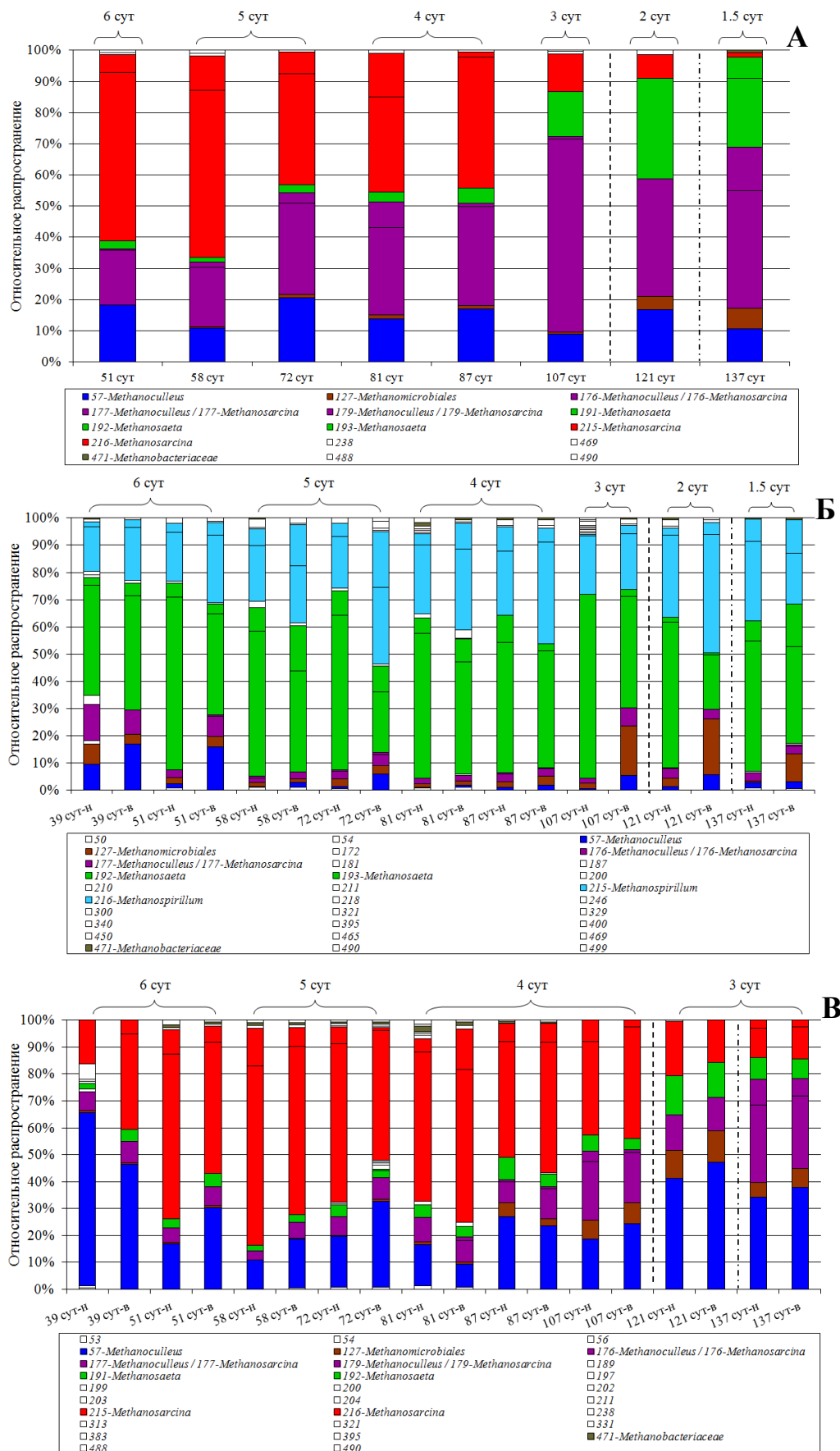


Рисунок 10 – Структура и динамика развития метаногенного сообщества в реакторах CSTR (А), FBR (Б) и ASBR (В) в соответствии с T-RFLP профилями *mcrA* ампликонов после их расщепления MspI. Пунктирными линиями показано время начала и прекращения внесения буферных растворов.

конверсию биомассы проводят в мезофильных условиях при 38-40°C. Удельный выход биогаза варьировал в диапазоне 304-331 л·кг⁻¹ осв с содержанием метана на уровне 52-55%. Значение pH поддерживали на уровне 7.6-7.8 в реакторе. Концентрация органических кислот и ионов аммония в первом образце достигала 1.1±0.06 г·л⁻¹ и 0.71±0.02 г·л⁻¹ соответственно, в то время как количество органических кислот и ионов аммония во втором образце достигало 1.3±0.08 г·л⁻¹ и 0.85±0.03 г·л⁻¹ соответственно.

3.2 Состав бактериального сообщества в реакторе

Определение состава бактериального консорциума в опытно-промышленном биогазовом реакторе осуществляли путем построения библиотеки клонов гена 16S рРНК. В общей сложности 288 клонов подвергли скринингу при помощи ПЦР и рестрикционного анализа. Далее из клонотеки отобрали 10 репрезентативных клонов для определения их нуклеотидных последовательностей. На основе результатов, полученных RDP классификатором, и длин T-RF были определены 9 ОТЕ. Так, анализ показал доминирование фил *Firmicutes* (6 ОТЕ), тогда как представители *Bacteroidetes* (2 ОТЕ) и *Proteobacteria* (1 ОТЕ) были обнаружены в минорном количестве.

На основе T-RFLP анализа наиболее распространенной бактериальной группой в реакторе оказалась фила *Firmicutes*, среди которой класс *Clostridia* был представлен наиболее разнообразными неизвестными филотипами. Среди всех клостридий, ОТЕ 3 (*Clostridiales*) доминировала в этом реакторе (до 40% от общей площади T-RF пиков). Все клоны гена бактериальной 16S рРНК, принадлежавшие к ОТЕ 1-3, имели 99-100% гомологию с некультивируемыми представителями, обнаруженными в различных анаэробных реакторах, и очень низкую идентичность с сиквенсами, соответствующими культивируемым бактериям. Другие клостридиальные филотипы – *Anaerotruncus* sp. с T-RF 295 и *Tissierella* sp. с T-RF 297 – также были обнаружены в высоких пропорциях (20-25%) в данном реакторе. Фрагмент HaeIII-295 имел 99% сходство с некультивируемыми бактериями и показал 89% BLAST идентичность к культивируемому микроорганизму *Anaerotruncus colihominis* (Lawson et al., 2004), в то время как фрагмент HaeIII-297 имел 95% гомологию с некультивируемыми клонами и 93% гомологию с культивируемым видом *Tissierella creatinophila* (Harms et al., 1998). *A. colihominis* ответственен за продукцию ЛЖК, главным образом уксусной и масляной кислот, из ряда сахаров и может генерировать сероводород (Lawson et al., 2004). *T. creatinophila* продуцирует те же самые ЛЖК, а также этанол и бутанол в качестве конечных продуктов метаболизма (Harms et al., 1998). Помимо участия в синтезе кислот и H₂, некоторые *Clostridiales* участвуют в конверсии целлюлозы (Fontes, Gilbert, 2010). Так, клостридиальные филотипы, участвуя в гидролизе целлюлозы, являются основными ацидогенами и ацетогенами, ответственными за ферментацию навоза и остаточной биомассы растений в данном реакторе.

Следующая группа, члены которой были обнаружены в исходном реакторе, была фила *Bacteroidetes* с T-RF 68 и T-RF 255. Количество представителей данной группы составило 2% и 9% от общей площади T-RF пиков в первой и второй точках соответственно. Все клоны гена 16S рРНК, принадлежавшие к ОТЕ 7 и 8

(*Bacteroidetes*), имели 99-100% идентичность с некультивируемыми бактериальными клонами. Члены этой филы могут расти на различных субстратах, и они, как правило, также встречаются в различных биогазовых реакторах (Kröber et al., 2009; Li et al., 2013). На основании полученных результатов можно предположить, что бактерии этой филы функционально были менее важны для совместной утилизации сельскохозяйственных отходов в данном реакторе. Другие представители факультативно анаэробных бактерий рода *Castellaniella* (фила *Proteobacteria*) с T-RF 226 также были идентифицированы среди T-RF профилей, но в незначительном количестве (до 3% от общей площади T-RF пиков).

3.3 Состав метаногенного сообщества в реакторе

Метаногенное разнообразие в опытно-промышленном биогазовом реакторе на основе анализа гена 16S рПНК архей сравнивали с данными, полученными после анализа гена *mcrA*. Большинство последовательностей обоих генов были тесно связаны с клонами, полученными из различных биогазовых реакторов. Скрининг 96 клонов гена 16S рПНК и 96 клонов гена *mcrA* при помощи ПЦР и рестрикционного анализа позволил определить 4 и 5 различных филотипов в реакторе соответственно. В соответствии с анализом генов 16S рПНК, 2 ОТЕ принадлежали гидрогенотрофному порядку *Methanomicrobiales* (*Methanoculleus* sp. и *Methanogenium* sp.) и 2 ОТЕ принадлежали порядку *Methanosarcinales* (*Methanosarcina* sp.). В соответствии с *mcrA* генами, 2 ОТЕ принадлежали гидрогенотрофному порядку *Methanomicrobiales* (*Methanoculleus* sp. и *Methanocorpusculum* sp.), 1 ОТЕ была отнесена к гидрогенотрофному семейству *Methanobacteriaceae* (*Methanobrevibacter* sp.) и 2 ОТЕ принадлежали порядку *Methanosarcinales* (*Methanosarcina* sp.).

На основе T-RFLP анализа архейное сообщество в данном реакторе было менее разнообразным, чем бактериальное сообщество. Так, представители рода *Methanosarcina* были найдены на высоком уровне (до 40% от общей площади T-RF пиков на основе анализа гена 16S рПНК). Фрагменты MseI-858 и MseI-557 показали 99% гомологию с некультивируемыми метаногенами и 97-99% идентичность с сиквенсами, соответствующими культивируемым *Methanosarcina* spp. Они являются ацетокластическими и метилотрофными организмами, и некоторые из них могут также использовать H_2/CO_2 в качестве метаногенных субстратов. Еще одним важным филотипом оказался гидрогенотрофный род *Methanoculleus* с T-RF 36, количество которого достигало 23% от общей площади T-RF пиков. ОТЕ 1 имела 99% BLAST идентичность с некультивируемыми археями и 97% сходство с культивируемым видом *Methanoculleus palmolei* (Zellner et al., 1998), который использует H_2/CO_2 , формиат для образования метана. Метаногенное сообщество, полученное на основе T-RFLP профилей *mcrA* гена, было представлено филотипами родов *Methanosarcina* (T-RF 178 и 216), *Methanoculleus* (T-RF 176), *Methanocorpusculum* (T-RF 176) и *Methanobrevibacter* (T-RF 470).

3.4 Взаимосвязь параметров анаэробного процесса со структурой микробного сообщества

Навоз КРС и остаточная растительная биомасса были подвергнуты анаэробной микробной конверсии в первом опытно-промышленном биогазовом

реакторе, располагающемся на животноводческой ферме Буинского муниципального района Республики Татарстан. Бактериальные и архейные гены 16S рРНК, а также метаногенные гены *mcrA* служили маркерами для идентификации микроорганизмов. Результаты данной работы четко показывают, что сырье, богатое целлюлозой, эффективно подвергалось биоразрушению при участии некоторых клостридиальных фило типов. Они также участвовали в стадиях ацидогенеза и ацетогенеза, в то время как метаногенез эффективно протекал при участии представителей родов *Methanosarcina* и *Methanoculleus*. Обнаружение некультивируемых бактериальных фило типов, демонстрирующих низкие BLAST сходства к культивируемым штаммам, означает, что данный биогазовый реактор таит в себе пул новых таксонов.

4 Биотрансформация отходов предприятий, производящих взрывчатую продукцию

4.1 Метаболизм нитроароматических соединений в анаэробных условиях

Анаэробную трансформацию нитроароматических соединений осуществляли совместно с навозом КРС и свиным навозом. В рамках данных экспериментов определяли влияние ТНТ на максимально возможное количество образующегося биогаза. В таблицах 5 и 6 отображены основные параметры анаэробной конверсии отходов сельского хозяйства в отсутствие и в присутствии ТНТ. Продолжительность экспериментов составила 20 суток.

На начальном этапе продукция биогаза в отсутствие ТНТ была выше в сравнении с экспериментами в присутствии исходного ксенобиотика. Однако после 3-х суток эксперимента выход биогаза повышался в опытах с ТНТ, что означает его трансформацию в менее токсичные метаболиты или их элиминацию. Максимально возможное количество образующегося биогаза в отсутствие и в присутствии ТНТ отличалось незначительно и варьировало в диапазоне 568-582 мл с содержанием метана на уровне 50-59%. Среди метаболитов после 2-х суточной инкубации навоза в присутствии ТНТ обнаружены такие продукты его биологической конверсии как 2-гидроксиламино-4,6-динитротолуол (2-ГАДНТ), 4-гидроксиламино-2,6-динитротолуол (4-ГАДНТ), 2-амино-4,6-динитротолуол (2-АДНТ) и 4-амино-2,6-динитротолуол (4-АДНТ). Дальнейшая инкубация приводила к трансформации обнаруженных метаболитов в 2,4-диамино-6-нитротолуол (2,4-ДАНТ) и 2,4,6-триаминотолуол (ТАТ). Времена удерживания всех обнаруженных метаболитов в условиях ВЭЖХ соответствовали таковым химических стандартов. Однако конечная концентрация обнаруженных метаболитов в нашей работе была ниже исходного количества ТНТ, что означает их дальнейшую трансформацию/деструкцию в неидентифицированные метаболиты и/или сорбцию на поверхности растительной биомассы. Последнее может являться альтернативой очистки объектов, загрязненных ТНТ и его метаболитами, заключающейся в плотном связывании поллютантов с органической частью (Thiele et al., 2002).

Определение состава бактериального и архейного консорциумов в четырех системах осуществляли путем T-RFLP анализа на 20 сутки эксперимента (Рисунок 11). Наиболее распространенной и разнообразной бактериальной группой во всех образцах была фила *Firmicutes* (до 86% от общей площади T-RF пиков),

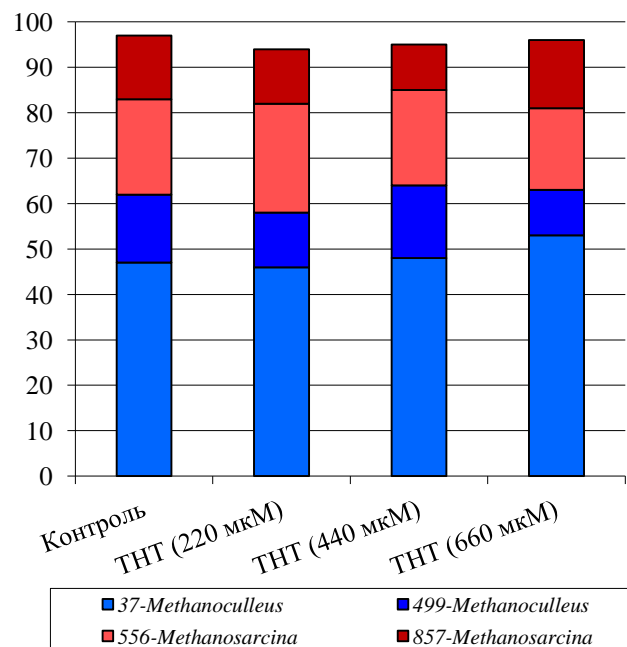
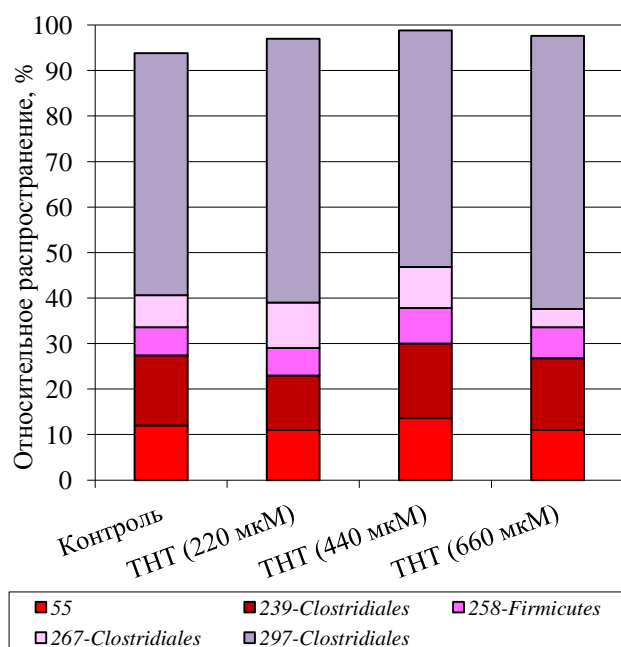
Таблица 5 – Исходные параметры анаэробного процесса в отсутствие и в присутствии ТНТ

Эксперимент	Температура (°C)	Состав субстрата (мл)				Сухое вещество (г)	Органическое сухое вещество (г)
		Навоз КРС	Свиной навоз	ТНТ (мг)	Сумма		
Контроль	40	50	100	-	150	4.8	3.3
ТНТ (220 мкМ)	40	50	100	7.5	~150	4.8	3.3
ТНТ (440 мкМ)	40	50	100	15.0	~150	4.8	3.3
ТНТ (660 мкМ)	40	50	100	22.5	~150	4.8	3.3

Таблица 6 – Основные параметры анаэробной переработки субстрата в отсутствие и в присутствии ТНТ

Эксперимент	Выход биогаза (мл)	Содержание CH ₄ (%)	pH	ЛЖК (г·л ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (г·л ⁻¹)
Контроль	582±21	51-58	7.9±0.02	3.2±0.15	3.35±0.12
ТНТ (220 мкМ)	568±33	51-59	7.9±0.04	2.9±0.24	3.32±0.17
ТНТ (440 мкМ)	576±15	51-58	7.9±0.03	3.3±0.14	3.42±0.13
ТНТ (660 мкМ)	572±18	50-58	7.9±0.08	3.3±0.11	3.46±0.10

Данные удельного выхода биогаза и содержание метана представлены как значения, полученные в течение всего экспериментального периода, тогда как значения pH, ЛЖК и NH₄⁺-N – в последней точке отбора проб, когда микробные сообщества были проанализированы (n=3).



среди которой преобладающими фило типами были определены неизвестные представители *Clostridiales*. Это означает их участие как в стадиях гидролиза, ацидогенеза и ацетогенеза, так и в конверсии ТНТ. Среди архейных сообществ преобладали представители двух родов – *Methanoculleus* (до 63%) и *Methanosarcina* (до 36%) (Рисунок 12).

4.2 Метаболизм нитроароматических соединений в аэробных условиях с их последующей обработкой в анаэробных условиях

4.2.1 Культивирование штаммов *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 и *Y. lipolytica* ВКПМ Y-3492 в отсутствие и в присутствии ТНТ

В настоящей работе протестированы два аэробных штамма дрожжей – *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3492 и *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037, способных осуществлять деструкцию ТНТ. Внесение клеток *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 до конечной A_{600} 1.0 в ТНТ-содержащую синтетическую среду (рН среды 6.0) на начальном этапе сопровождалось мажорным накоплением 3-Н⁻-ТНТ и минорной аккумуляцией 1-Н⁻-ТНТ (моногидридные комплексы Мейзенхейме-ра), 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ (Рисунок 13А). Вначале эксперимента наблюдалась частичная конверсия 3-Н⁻-ТНТ в некоторые другие ТНТ-гидридные формы, однако их концентрация оставалась невысокой. На начальном этапе происходило и накопление NO_2^- (Рисунок 13Б). Следующий этап культивирования *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 (после 5-6 ч) сопровождался снижением концентрации 3-Н⁻-ТНТ и одновременной масштабной продукцией остальных моногидридных и дигидридных комплексов Мейзенхеймера, а также вел к увеличению количества ГАДНТ. Кроме того, стадия снижения 3-Н⁻-ТНТ сопровождалась и образованием 2,4-ДНТ и NO_3^- (Рисунок 13).

Культивирование штамма *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 в аэробных условиях роста в присутствии исходного ксенобиотика вело к падению рН с 6.0 до 2.9 в течение 11 ч эксперимента (Рисунок 13Б). Стоит отметить, что формирование 2,4-ДНТ клетками дрожжей начиналось только на стадии исчезновения 3-Н⁻-ТНТ (после снижения рН) и продолжалось до полного исчезновения 3-Н⁻-ТНТ. Параллельно методом ионной хроматографии была выявлена аккумуляция NO_3^- , тогда как NO_2^- образовывался в низкой концентрации (Рисунок 13Б). В контрольном варианте, без ТНТ, образование нитрит- и нитрат-ионов не было выявлено, что говорит о непосредственном участии исходного ксенобиотика в их формировании. Кислотообразование *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 и связанное с этим снижение рН культуральной жидкости сопровождалось деструкцией сформировавшегося 3-Н⁻-ТНТ и образованием 2,4-ДНТ, а также конверсией NO_2^- в NO_3^- . Однако нельзя исключать и отщепление нитрогруппы от исходного ксенобиотика не в виде NO_2^- , а непосредственно в виде NO_3^- . Предположительно, что в окислительных реакциях – NO_2^- в NO_3^- , а также 3-Н⁻-ТНТ в NO_3^- и 2,4-ДНТ – участвует один фермент, утилизирующий NO_2^- и 3-Н⁻-ТНТ в форме субстратов. В пользу этого указывает и тот факт, что при деструкции 3-Н⁻-ТНТ и образовании 2,4-ДНТ добавление в среду роста экзогенного (дополнительного) источника NO_2^- – NaNO_2 (100 мкМ) – сопровождалось значительным снижением выхода 2,4-ДНТ (с 46 до 14 мкМ) и дальнейшей конверсией 3-Н⁻-ТНТ в 3,5-2Н⁻-ТНТ и изомеры 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺; внесенный NO_2^- окислялся в NO_3^- (Рисунок 14). Схожие результаты

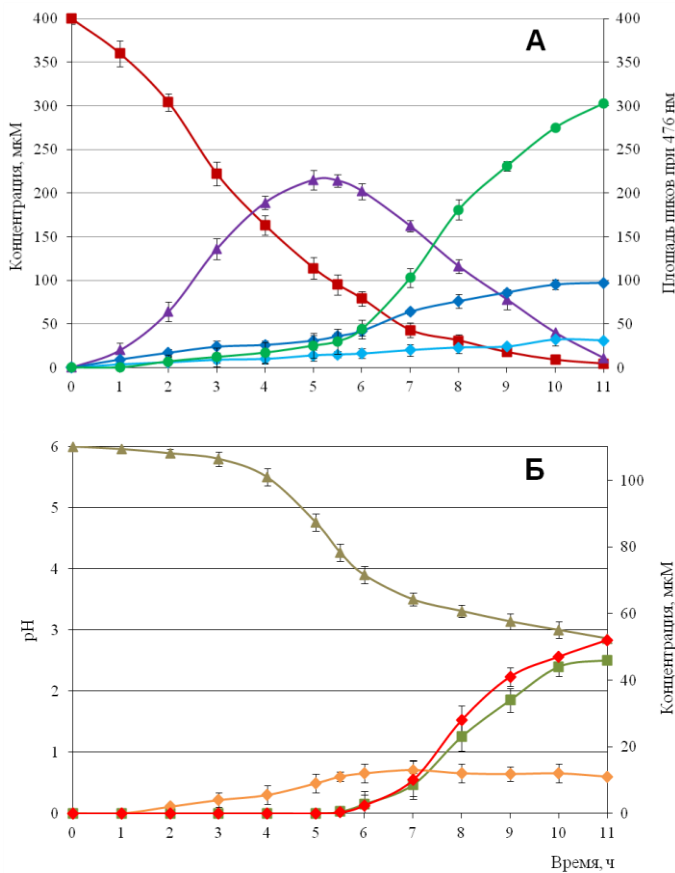


Рисунок 13 – Образование метаболитов в процессе трансформации ТНТ штаммом *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 в аэробных условиях роста. Символы: (А) ■, ТНТ; ▲, 3-Н-ТНТ; ◆, 2-ГАДНТ; ◆, 4-ГАДНТ (мкМ); ●, остальные гидридные комплексы Мейзенхеймера (выражены как суммарная площадь их ВЭЖХ-пики). (Б) ■, 2,4-ДНТ; ◆, NO_2^- ; ◆, NO_3^- (мкМ); ▲, pH.

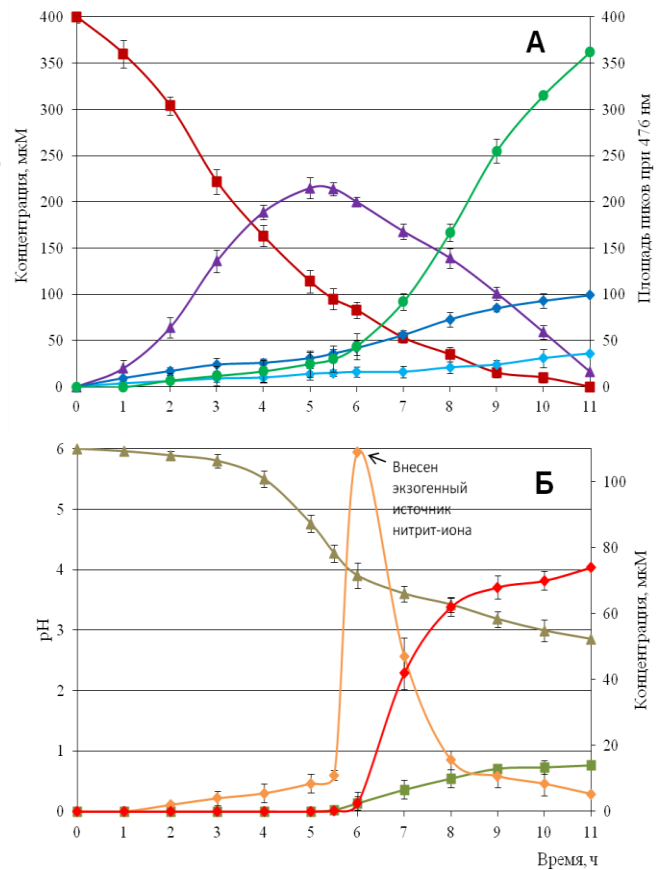


Рисунок 14 – Образование метаболитов в процессе трансформации ТНТ культурой *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037 в аэробных условиях. На стадии накопления 2,4-ДНТ в среду был добавлен NaNO_2 (100 мкМ) в качестве экзогенного источника NO_2^- . Символы: (А) ■, ТНТ; ▲, 3-Н-ТНТ; ◆, 2-ГАДНТ; ◆, 4-ГАДНТ (мкМ); ●, остальные гидридные комплексы (выражены как площадь их ВЭЖХ-пики). (Б) ■, 2,4-ДНТ; ◆, NO_2^- ; ◆, NO_3^- (мкМ); ▲, pH.

были получены и штаммом *Y. lipolytica* ВКПМ Y-3492.

С использованием метода ЭПР-спектроскопии нам также удалось обнаружить образование внеклеточного NO в процессе трансформации ТНТ клетками *Y. lipolytica* и *Geotrichum* sp. Спектры комплекса $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$, образованные при взаимодействии ловушки NaДЭТК с железом и NO в наших системах, соотносятся с данными ранних работ, в которых исследователи изучали процесс образования NO в других системах (Fujii, Berliner 1999; Ueno et al., 2002). Предположительно, выделение NO – процесс абиотический, в результате реакции NO_2^- в NO и NO_3^- , а также NO_2^- в NO и NO_2 при пониженных значениях pH окружающей среды.

4.2.2 Последующая обработка трансформированных соединений в анаэробных условиях

Анаэробную трансформацию метаболитов ТНТ, полученных в аэробных условиях, осуществляли совместно с навозом КРС и свиным навозом в герметично закрытых бутылках объемом на 0.3 л без перемешивания. Предварительную аэробную трансформацию ТНТ при участии дрожжей проводили при исходной концентрации ТНТ 440 мкМ. В рамках данных экспериментов определяли максимально возможное количество образующегося биогаза при совместной анаэробной утилизации сельскохозяйственных отходов и метаболитов, полученных в процессе трансформации и глубокой деструкции ТНТ аэробными штаммами *Y. lipolytica* ВКПМ Y-3492 и *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037. Продолжительность экспериментов составила 20 суток.

Таблица 7 – Исходные параметры анаэробного процесса в отсутствие и в присутствии метаболитов ТНТ, полученных в аэробных условиях

Эксперимент	Температура (°C)	Состав субстрата (мл)				
		Навоз КРС	Свиной навоз	Продукты деградации ТНТ + биомасса дрожжей	Биомасса дрожжей	Сумма
Контроль (<i>Y. lipolytica</i>)	40	50	100	-	50	200
<i>Y. lipolytica</i> + метаболиты ТНТ	40	50	100	50	-	200
<i>Geotrichum</i> sp. + метаболиты ТНТ	40	50	100	50	-	200

Таблица 8 – Основные параметры анаэробной переработки субстрата в отсутствие и в присутствии метаболитов ТНТ, полученных в аэробных условиях

Эксперимент	Выход биогаза (мл)	Содержание CH ₄ (%)	pH	Органические кислоты (г·л ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (г·л ⁻¹)
Контроль (<i>Y. lipolytica</i>)	870±23	52-58	7.7±0.06	2.4±0.22	2.72±0.18
<i>Y. lipolytica</i> + метаболиты ТНТ	859±18	53-58	7.8±0.03	2.6±0.19	2.62±0.13
<i>Geotrichum</i> sp. + метаболиты ТНТ	843±28	53-59	7.7±0.04	2.5±0.18	2.51±0.10

Данные удельного выхода биогаза и содержание метана представлены как значения, полученные в течение всего экспериментального периода, тогда как значения pH, ЛЖК и NH₄⁺-N – в последней точке отбора проб, когда микробные сообщества были проанализированы.

Как видно из таблиц 7 и 8, максимально возможное количество образующегося газа в отсутствие и в присутствии метаболитов ТНТ отличалось незначительно и варьировало в диапазоне 843-870 мл с содержанием метана на уровне 52-59%. Значения pH, концентрации ЛЖК и ионов аммония находились приблизительно на одном уровне на 20 сутки эксперимента. Все метаболиты ТНТ были подвержены эффективному анаэробному элиминированию. Так, на конец эксперимента ни один из метаболитов ТНТ, детектируемых в аэробных условиях, не был обнаружен в отсутствие O₂, что означает их полную конверсию при комбинации двух режимов. Кроме того, был зафиксирован повышенный выход биогаза в сравнении с экспериментами анаэробной трансформации ТНТ. Все это

указывает на высокую эффективность сочетания аэробной и анаэробной трансформации исходного ксенобиотика и его метаболитов. Определение состава бактериального и архейного консорциумов в трех анаэробных установках осуществляли путем T-RFLP анализа на 20 сутки эксперимента. Независимо от образца, наиболее распространенной бактериальной группой оказался порядок *Clostridiales* (до 81% от общей площади T-RF пиков). Это указывает на их ключевую роль как в гидролизе и ацидогенезе, так и в конверсии метаболитов ТНТ. Среди метаногенных сообществ преобладали представители двух родов – *Methanoculleus* (до 55%) и *Methanosarcina* (до 40%). Обнаружение представителей *Clostridiales*, *Methanoculleus* и *Methanosarcina* во всех образцах означает их основную роль в обезвреживании отходов различного происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие основные заключения:

1. Получены структурированные знания о таксономической принадлежности бактериальных и архейных участников анаэробной конверсии различных органических отходов в реакторах с непрерывным перемешиванием в зависимости от параметров анаэробного процесса посредством применения современных методов молекулярно-генетического анализа (пиросеквенирование, секвенирование, клонирование, T-RFLP анализ). Наиболее распространенными бактериальными филлами во всех протестированных реакторах оказались неизвестные *Firmicutes* (в основном класс *Clostridia*) и *Bacteroidetes* (в основном класс *Bacteroidia*), но в разном количестве. Следующими филлами, присутствовавшими в различных пропорциях во всех реакторах, были *Tenericutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Lentisphaerae* и *Synergistetes*. Другие филлы как *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Thermotogae* и кандидаты на подразделение OD1, TM7 и SR1 присутствовали в большинстве образцов, но в незначительных количествах. Повышение температуры с 38°C до 55°C приводило к снижению некоторых филотипов *Bacteroidetes* и увеличению неизвестных *Clostridiales*. Среди архейных сообществ преобладали метаногены филлы *Euryarchaeota*, в основном члены порядков *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* и *Methanobacteriales*. Выявлено, что анаэробная обработка навоза КРС и барды, навоза и кукурузного силоса низкого качества, а также жмыха семян *Jatropha* сопровождалась самым высоким удельным выходом биогаза. Меньшее количество биогаза выделялось при совместной утилизации навоза КРС и куриного помета, а также навоза КРС и соломы кукурузы. Выявлено ингибирование ацетокластического метаногенеза в реакторе, утилизирувавшем навоз КРС и куриный помет. В связи с этим, синтрофное окисление ацетата в качестве основного процесса его поглощения можно предположить в данном реакторе.

2. Установлены основные участники анаэробной конверсии отходов спиртовой промышленности в биогаз. Так, преобладающими бактериальными филотипами в реакторах с непрерывным перемешиванием, утилизирувавших барду стандарта DDGS, были идентифицированы неизвестные представители филлы

Bacteroidetes. Следующими филами, присутствовавшими в различных пропорциях в данных реакторах, оказались *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Synergistetes* и *Proteobacteria*. Среди архейных сообществ преобладали метаногенные археи филы *Euryarchaeota*: *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*. Впервые обнаружено, что синтрофные связи между ацетогенными бактериями и ацетокластическими метаногенами были лучше установлены в реакторах, снабжаемых дополнительным источником Fe^{3+} . Показано, что метаногены рода *Methanosarcina* являются индикаторными организмами для эффективного и стабильного процесса получения биогаза из DDGS при высокой нагрузке по органике, тогда как метаногены рода *Methanosaeta* являются указателями стабильного ацетокластического метаногенеза при низкой нагрузке по органике. Выявлено ингибирование метаногенов сероводородом в отсутствие внесенного FeCl_3 в реакторы. Показана целесообразность внесения ионов Fe^{3+} в лабораторные установки для осаждения токсичного сероводорода в виде нетоксичного сульфида железа. Внесение ионов Fe^{3+} в реакторы сопровождалось развитием разнообразного метаногенного консорциума и более эффективной анаэробной деструкцией послеспиртовой барды с повышенным выходом биогаза ($\sim 520 \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$ в отсутствие и $\sim 610 \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$ в присутствии внесенного железа).

3. Впервые выявлены эффекты (1) снижения времени удерживания субстрата и (2) иммобилизации микроорганизмов на различных носителях на активность микроорганизмов и стабильность работы реакторов различной модификации в процессе утилизации жидкой фракции послеспиртовой барды. Выявлено, что постепенное снижение времени удерживания субстрата вызывало изменения в структуре водород-продуцирующего бактериального, а также метаногенного сообществ во всех реакторах. Среди водород-продуцирующего бактериального сообщества обнаружены неизвестные представители фил *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* и *Proteobacteria*, тогда как среди архейных ассоциаций преобладали метаноархеи филы *Euryarchaeota*: *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*. Обнаружено, что даже в реакторе с непрерывным перемешиванием в отсутствие иммобилизации микроорганизмов снижение времени удерживания с 6 до 3 суток не вызывало превышающего вымывания метаногенных архей. С уменьшением времени удерживания нестабильность анаэробного процесса сначала наблюдалась в реакторе переменного действия, а далее в реакторе с непрерывным перемешиванием. Реактор с неподвижным слоем стабильно функционировал до конца эксперимента.

4. Впервые были исследованы анаэробные микроорганизмы и выявлены ключевые параметры анаэробной конверсии отходов агропромышленного комплекса в первом опытно-промышленном биогазовом реакторе, функционирующем на животноводческой ферме Буинского муниципального района Республики Татарстан. Получены данные о разнообразии микробных ассоциаций данного реактора с учетом природно-климатических условий Республики Татарстан. Среди бактерий доминировали неизвестные представители класса *Clostridia*, тогда как среди архейных ассоциаций преобладали метаногенные археи родов *Methanosarcina* и *Methanoculleus*.

5. Впервые изучено влияние нитроароматических ксенобиотиков, в частности токсичных 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) и его метаболитов, на состав микробных сообществ и процесс анаэробной трансформации отходов сельского хозяйства. Оценен потенциал трансформации ТНТ анаэробными микроорганизмами и выявлены основные пути метаболизма ТНТ в анаэробных условиях. Так, основными начальными метаболитами трансформации ТНТ в анаэробных условиях оказались гидроксиламино-динитротолуолы и аминок-динитротолуолы. Дальнейшая инкубация приводила к трансформации данных метаболитов в 2,4-диамино-6-нитротолуол и 2,4,6-триаминотолуол с постепенным их исчезновением. Предполагается их прочное связывание с растительной биомассой в анаэробных условиях, что может являться альтернативой очистки объектов, загрязненных ТНТ и его метаболитами. Среди бактерий в наибольшем количестве были обнаружены некультивируемые представители порядка *Clostridiales*, тогда как среди метаногенного сообщества преобладали члены порядков *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*.

6. Впервые проведена предварительная биодеструкция ТНТ аэробными микроорганизмами с последующей обработкой полученных метаболитов в анаэробных условиях. Протестированы два аэробных штамма дрожжей – *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3492 и *Geotrichum* sp. ВКПМ F-1037, способные отщеплять нитрогруппы от молекулы ТНТ. Выявлен положительный эффект сочетания аэробной и анаэробной трансформации исходного поллютанта и его метаболитов. В данных условиях среди анаэробных бактерий в наибольшем количестве также были идентифицированы неизвестные представители порядка *Clostridiales*, тогда как среди метаногенного консорциума преобладали члены порядков *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*, что означает их основную роль в утилизации отходов различного происхождения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, включенных в список ВАК:

1. **Ziganshin, A.M.** Influence of pH on 2,4,6-trinitrotoluene degradation by *Yarrowia lipolytica* / A.M. Ziganshin, R.P. Naumova, A.J. Pannier, R. Gerlach // *Chemosphere*. – 2010. – V. 79, No 4. – P. 426–433.
2. **Ziganshin, A.M.** Bacteria and archaea involved in anaerobic digestion of distillers grains with solubles / A.M. Ziganshin, T. Schmidt, F. Scholwin, O.N. Il'inskaya, H. Harms, S. Kleinstuber // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – V. 89, No 6. – P. 2039–2052.
3. **Ziganshin, A.M.** Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials / A.M. Ziganshin, J. Liebetrau, J. Pröter, S. Kleinstuber // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97, No 11. – P. 5161–5174.
4. Khilyas, I.V. Effect of ferrihydrite on 2,4,6-trinitrotoluene biotransformation by an aerobic yeast / I.V. Khilyas, **A.M. Ziganshin**, A.J. Pannier, R. Gerlach // *Biodegradation*. – 2013. – V. 24, No 5. – P. 631–644.
5. Schmidt, T. Effects of the reduction of the hydraulic retention time to 1.5 days at constant organic loading in CSTR, ASBR, and fixed-bed reactors – Performance and

- methanogenic community composition / T. Schmidt, **A.M. Ziganshin**, M. Nikolausz, F. Scholwin, M. Nelles, S. Kleinsteuber, J. Pröter // *Biomass and Bioenergy*. – 2014. – V. 69. – P. 241–248.
6. Ziganshina, E.E. Assessment of a biogas-generating microbial community in a pilot-scale anaerobic reactor / E.E. Ziganshina, A.R. Bagmanova, I.V. Khilyas, **A.M. Ziganshin** // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2014. – V. 117, No 6. – P. 730–736.
 7. Ziganshina, E.E. Microbial community diversity in anaerobic reactors digesting turkey, chicken, and swine wastes / E.E. Ziganshina, D.E. Belostotskiy, R.V. Shushlyaev, V.A. Miluykov, P.Y. Vankov, **A.M. Ziganshin** // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 24, No 11. – P. 1464–1472.
 8. **Ziganshin, A.M.** Pathways of 2,4,6-trinitrotoluene transformation by aerobic yeasts / A.M. Ziganshin, R. Gerlach // In S.N. Singh (ed.), *Biological remediation of explosive residues*, Environmental science and engineering. – Springer International Publishing AG, Switzerland, 2014. – P. 301–311.
 9. **Ziganshin, A.M.** Fe(III) mineral reduction followed by partial dissolution and reactive oxygen species generation during 2,4,6-trinitrotoluene transformation by the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* / A.M. Ziganshin, E.E. Ziganshina, J. Byrne, R. Gerlach, E. Struve, T. Biktagirov, A. Rodionov, A. Kappler // *AMB Express*. – 2015. – V. 5, No 1. – P. 1–12.
 10. **Зиганшин, А.М.** Аэробная деградация 2,4,6-тринитротолуола штаммом дрожжей *Geotrichum candidum* AN-Z4 / А.М. Зиганшин, Р. Герлах, Е.А. Науменко, Р.П. Наумова // *Микробиология*. – 2010. – Т. 79, № 2. – С. 199–205.
 11. Хияс, И.В. Биodeградация 2,4,6-тринитротолуола гемияскомицетными дрожжами в условиях непрерывного режима культивирования / И.В. Хияс, Л.Ф. Сафиуллина, А.А. Родионов, **А.М. Зиганшин** // *Ученые записки Казанского университета. Естественные науки*. – 2010. – Т. 152, № 4. – С. 179–189.
 12. **Зиганшин, А.М.** Видовой состав сообществ архей в анаэробных биогазовых реакторах / А.М. Зиганшин, Т. Шмидт, Ф. Шольвин, С. Кляйнштаубер // *Ученые записки Казанского университета. Естественные науки*. – 2011. – Т. 153, № 2. – С. 100–109.
 13. Сибгатуллина, Э.Э. Способ утилизации послеспиртовой барды с использованием биогазовой технологии / Э.Э. Сибгатуллина, **А.М. Зиганшин** // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2011. – № 4/1 (38). – С. 13–15.
 14. **Зиганшин, А.М.** Динамика развития метаногенного сообщества в процессе анаэробной утилизации отходов агропромышленного комплекса / А.М. Зиганшин, Э.Э. Зиганшина, С. Кляйнштаубер, Ю. Протер, О.Н. Ильинская // *Acta Naturae*. – 2012. – Т. 4, № 4 (15). – С. 94–100.

Патенты на изобретения:

1. Патент 2437930 Российская Федерация. Биосенсор для определения 2,4,6-тринитротолуола / Хияс И.В., **Зиганшин А.М.**, Наумова Р.П.; № 2010132746/10; заявл. 04.08.2010; опубл. 27.12.2011, Бюл. №36.
2. Патент 2451066 Российская Федерация. Штамм дрожжей *Geotrichum* sp., осуществляющий биологическую деградацию 2,4,6-тринитротолуола /

- Зиганшин А.М.**, Хиляс И.В., Ильинская О.Н.; № 2010132747/10; заявл. 04.08.2010; опубл. 20.05.2012, Бюл. №14.
3. Патент 2453508 Российская Федерация. Способ биологической очистки воды от тринитротолуола / Хиляс И.В., **Зиганшин А.М.**; № 2010132748/10; заявл. 04.08.2010; опубл. 20.06.2012, Бюл. №17.
 4. Патент 2467064 Российская Федерация. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ У-3492 – деструктор тринитротолуола / **Зиганшин А.М.**, Ильинская О.Н., Наумова Р.П., Наумов А.В., Хиляс И.В.; № 2010105120/10; заявл. 12.02.2010; опубл. 20.11.2012, Бюл. №32.

Тезисы в сборниках материалов конференций:

1. Belostotskiy, D.E. Microbial community diversity in biogas reactors digesting turkey, chicken and swine wastes / D.E. Belostotskiy, E.E. Ziganshina, R.V. Shushlyaev, V.A. Milyukov, P.Y. Vankov, **A.M. Ziganshin** // 2nd International Conference on Biogas Microbiology ICBM. – Uppsala, Sweden, 2014. – P. 2.
2. Liebetrau, J. Reduction of the hydraulic retention time to 1.5 days in a CSTR – performance and methanogenic community / J. Liebetrau, T. Schmidt, **A.M. Ziganshin**, M. Nikolausz, F. Scholwin, M. Nelles, S. Kleinsteuber, J. Pröter // 2nd International Conference on Biogas Microbiology ICBM. – Uppsala, Sweden, 2014. – P. 5.
3. Ваньков, П.Ю. Микробные сообщества анаэробных реакторов, утилизирующих отходы животноводства / П.Ю. Ваньков, Э.Э. Зиганшина, Д.Е. Белостоцкий, Р.В. Шушляев, В.А. Милуков, **А.М. Зиганшин** // IV Международная научно-практическая конференция “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине”. – Казань, 2014. – С. 27.
4. Багманова, А.Р. Микробная конверсия органического сырья с получением биотоплива / А.Р. Багманова, Э.Э. Зиганшина, **А.М. Зиганшин** // I Международная интернет-конференция “Энергетика в современном мире”. – Казань, 2013. – С. 3–5.
5. Зиганшина, Э.Э. T-RFLP анализ в исследовании структуры микробных сообществ, участвующих в анаэробной утилизации отходов сельского хозяйства / Э.Э. Зиганшина, А.Р. Багманова, В.В. Туфатулин, **А.М. Зиганшин** // II Интернет-конференция “Грани науки – 2013”. – Казань, 2013. – С. 405–406.
6. Babett, A. Functional compartmentalization in a lab-scale anaerobic baffled reactor for *in situ* biogas upgrading / A. Babett, J. Seifert, **A.M. Ziganshin**, M. Carstensen, H. Schneider, J. Born, S. Kleinsteuber // 14th International Symposium on Microbial Ecology. – Copenhagen, Denmark, 2012. – P. 2–3.
7. **Ziganshin, A.M.** Microbial community structure and dynamics in anaerobic digestion of various agricultural waste materials / A.M. Ziganshin, J. Liebetrau, J. Pröter, S. Kleinsteuber // 1st International Conference on Biogas Microbiology ICBM. – Leipzig, Germany, 2011. – P. 120.
8. Babett, A. Functional community dynamics in a lab-scale anaerobic baffled reactor for *in situ* biogas upgrading / A. Babett, **A.M. Ziganshin**, M. Carstensen, M. Schwarz, H. Schneider, J. Born, S. Kleinsteuber // 1st International Conference on Biogas Microbiology ICBM. – Leipzig, Germany, 2011. – P. 68.
9. Kleinsteuber, S. Bacteria and archaea involved in anaerobic digestion of distillers grains / S. Kleinsteuber, **A.M. Ziganshin**, T. Schmidt, H. Harms // Annual Congress of the

- General and Applied Microbiology Association (VAAM). – Karlsruhe, Germany, 2011. – P. 177.
10. Nikolausz, M. A functional gene diversity approach to assess the effect of substrate on microbial community structures in biogas reactors / M. Nikolausz, **A.M. Ziganshin**, J. Liebetrau, T. Schmidt, K. Schneider, S. Kleinsteuber // International Water Association – IWA’s specialized conference on “Microbes in Wastewater and Waste Treatment, Bioremediation and Energy Production”. – Goa, India, 2011. – P. 111.
 11. **Зиганшин, А.М.** Утилизация органических отходов спиртового производства с получением биогаза / **А.М. Зиганшин**, Э.Э. Сибгатуллина // II Всероссийская интернет-конференция “Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии”. – Казань, 2011. – С. 370–372.
 12. Хиляс, И.В. Биосенсор для детекции токсичных нитроароматических ксенобиотиков / И.В. Хиляс, **А.М. Зиганшин**, Р.П. Наумова // X Всероссийская выставка научно-технического творчества молодежи. – Москва, 2010. – С. 36.
 13. **Ziganshin, A.M.** Deep destruction of ecologically hazardous nitroaromatics by *Yarrowia lipolytica* and *Geotrichum candidum* / **A.M. Ziganshin** // XIV International Conference devoted to the 20th Anniversary of Partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University “Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine”. – Kazan, 2009. – P. 70–71.
 14. Хиляс, И.В. Трансформация 2,4,6-тринитротолуола низшими эукариотами в условиях непрерывного культивирования / И.В. Хиляс, Л.Ф. Сафиуллина, **А.М. Зиганшин** // XVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов”. – Москва, 2009. – С. 174–175.
 15. Safiullina, L.F. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene through the aromatic ring reduction / L.F. Safiullina, **A.M. Ziganshin**, A.P. Lozhkin, I.V. Khilyas, R.P. Naumova // First Interuniversity Conference on Modern Biology “Bio-news”. – Kazan, 2008. – P. 36–37.
 16. Timonina, E.V. Toxicological aspects of reactive oxygen species generation in 2,4,6-trinitrotoluene transformation / E.V. Timonina, A.P. Lozhkin, **A.M. Ziganshin**, R.P. Naumova // First Interuniversity Conference on Modern Biology “Bio-news”. – Kazan, 2008. – P. 35–36.
 17. Subkhangulova, A.R. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by callus culture of *Fagopyrum tataricum* / A.R. Subkhangulova, E.A. Naumenko, A.P. Lozhkin, **A.M. Ziganshin**, R.P. Naumova // First interuniversity conference on modern biology “Bio-news”. – Kazan, 2008. – P. 32.
 18. Хиляс, И.В. Образование восьми различных гидридных комплексов Мейзенгеймера при трансформации 2,4,6-тринитротолуола аэробными дрожжами / И.В. Хиляс, **А.М. Зиганшин**, Р.П. Наумова // Вестник Российской военно-медицинской академии. Приложение 2. Конгресс “Экотоксиканты и здоровье человека”. – 2008. – № 3 (23). – С. 167.
 19. Gerlach, R. Two different pathways of TNT transformation – nitro group and aromatic ring reduction – are influenced by biotic and abiotic processes / R. Gerlach, **A.M. Ziganshin**, R.P. Naumova // Environmental and Subsurface Science Symposium, featuring Biotechnology and Bioremediation. – Logan, Utah, USA, 2007. – P. 5.

20. Naumenko, E.A. Generation of superoxide in 2,4,6-trinitrotoluene microbial transformation / E.A. Naumenko, A.P. Lozhkin, **A.M. Ziganshin**, R.P. Naumova, N.I. Silkin // International Conference “Modern Development of Magnetic Resonance”. – Kazan, 2007. – P. 213–214.
21. Хиляс, И.В. Гидридное восстановление 2,4,6-тринитротолуола грибами родов *Candida* и *Geotrichum* / И.В. Хиляс, Е.А. Науменко, А.П. Ложкин, **А.М. Зиганшин**, Р.П. Наумова // 11 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пушино, 2007. – С. 51.
22. Хиляс, И.В. Редукция ароматического кольца 2,4,6-тринитротолуола – путь, ведущий к его разрушению / И.В. Хиляс, **А.М. Зиганшин**, Е.А. Науменко, Р.П. Наумова // Региональная конференция молодых ученых с международным участием “Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии”. – Екатеринбург-Пермь, 2007. – С. 29–30.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному консультанту д.б.н., профессору кафедры микробиологии КФУ Ольге Николаевне Ильинской за неоценимую помощь при подготовке диссертационной работы.

Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., профессору Р.П. Наумовой (кафедра микробиологии КФУ), Prof. Dr. Robin Gerlach и Dr. John Neuman (Montana State University, США), Dr. Frank Scholwin и Dr. Thomas Schmidt (German Biomass Research Centre, Германия), Dr. Sabine Kleinsteuber (Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Германия), Prof. Dr. Andreas Kappler (Eberhard Karls University, Германия), к.т.н. Д.Е. Белостоцкому и д.х.н. В.А. Милюкову (ИОФХ им. А.Е. Арбузова), к.х.н. А.В. Гарусову (кафедра микробиологии КФУ), А.А. Родионову (Институт физики КФУ), к.б.н. А.И. Колпакову (кафедра микробиологии КФУ).

Автор считает своим приятным долгом принести искреннюю благодарность всем преподавателям и научным сотрудникам кафедры микробиологии КФУ.

E-mail автора: ayrat_ziganshin@bk.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru.